



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

Présentée et soutenue par Mlle Isabelle OLIVIER

Le 17/05/2011

Titre : *Les tissus adipeux mésentérique et le tissu rampant dans l'inflammation intestinale: Description et implication physiopathologique*

JURY

Président: Professeur Bernard Francés
Rapporteur: Dr Frederic Bost
Rapporteur: Dr Pierre Desreumaux
Examineur: Dr Pauline Anton
Membre invité: Dr Vassilia Théodorou
Membre invité: Dr Philippe Valet

Ecole doctorale : *Biologie Santé et Biotechnologie*
Unité de recherche : *Toxalim E04*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Hélène Eutamène et Dr Laurent Ferrier*
Rapporteurs : *Dr Pierre Desreumaux et Dr Frederic Bost*

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	8
PARTIE 1 DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	9
Chapitre I : Aspects Cliniques Et Epidemiologiques Des Maladies Inflammatoires Chroniques De L'intestin	10
I. Généralités, historique	10
II. Epidémiologie.....	10
III. Etiologie	11
III.1. Les facteurs génétiques.....	11
III.2. Les facteurs environnementaux	12
III.3. Facteurs infectieux.....	13
IV. Classification clinique	14
V. Symptômes	15
V.1. Signes cliniques	15
V.2. Signes anatomo-pathologiques	17
V.3. Complications intestinales	18
VI. Traitements des MICI	21
VI.1. Les traitements pharmacologiques	21
VI.2. Les traitements d'appoint	23
VI.3. La chirurgie	24
VI.4. Les futures cibles thérapeutiques.....	25
Chapitre II : L'inflammation : Notions Generales.....	27
I. L'immunité innée.....	28
I.1. Les TLRs.....	29
I.2. Les défensines	30
I.3. Les cellules dendritiques	31
I.4. Les polynucléaires.....	31
I.5. Les macrophages	32
II. L'immunité acquise	35
II.1. Les lymphocytes B.....	36
II.2. Les lymphocytes T	37
Chapitre III : La Barriere Intestinale Dans Les Maladies Inflammatoires Chroniques De L'intestin	41
I. La barrière mécanique.....	42
II. La barrière écologique	42
III. La barrière physique ou barrière épithéliale	44
III.1. Les cellules différenciées.....	44
III.2. Les peptides antimicrobiens et plus particulièrement les défensines	45
III.3. Le mucus	47
III.4. Les jonctions intercellulaires	49
III.4.1. Les jonctions serrées :	49
III.4.2. Les jonctions adhérentes et les desmosomes :	51
IV. La barrière immunologique :	52
Chapitre IV : Les Modeles De Colite Experimentale Chez Le Rongeur	58
I. Modèles d'inflammation spontanée	58
I.1. Souris C3H/HeJ Bir	58
I.2. Souris SAMP/Yit	59
II. Modèles génétiques	59

II.1. Souris KO IL-2 :	59
II.2. Souris KO IL-10 :	60
II.3. STAT-3 :	60
III. Modèles de colite chimio-induite	60
III.1. Perturbation de la barrière intestinale : Dextran Sulfate Sodium.....	61
III.2. Colite induite par un haptène : Oxazolone/TNBS/DNBS.....	62
Chapitre V : Le Tissu Adipeux	64
I. Définition du tissu adipeux	64
I.1. L'adipocyte	64
I.2. La Fraction Stroma-Vasculaire (FSV).....	66
I.3. La « régionalisation » du TA chez l'homme sain.....	68
II. Les fonctions du TA	70
II.1. Le TA : un organe métabolique	70
II.2. Organe endocrine	72
Chapitre VI : Le Tissu Adipeux Dans Les Maladies Inflammatoires Chroniques De L'intestin.....	77
I. Inflammation du tissu adipeux	77
I.1. Les adipokines : des médiateurs entre le tissu adipeux, l'inflammation et l'immunité.	78
I.2. Les macrophages du tissu adipeux	82
I.3. Toll like receptors (TLR) et tissu adipeux.....	82
I.4. Liens moléculaires entre le tissu adipeux et les macrophages.....	84
II. Modifications du tissu adipeux au sein des MICI.....	85
II.1. L'hypertrophie du tissu adipeux viscéral dans la maladie de Crohn.....	85
II.2. Le « creeping fat »	86
III. Les adipocytokines dans les MICI	87
III.1. La leptine dans les MICI	87
III.2. L'adiponectine dans les MICI	88
III.3. Les cytokines pro-inflammatoires:	89
PARTIE 2 RESULTATS EXPERIMENTAUX	91
Resultat 1 : Les Modifications Du Tissu Adipeux Mesenterique Au Cours De La Colite Experimentale Chez La Souris	92
Resultat 2 : Le Creeping-Fat, Un Tissu Adipeux?	93
Resultat 3 : Effets opposés Des Sécrétions Du Creeping-Fat Sur La Barrière Intestinale en conditions non-inflammatoires et inflammatoires	95
PARTIE 3 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	97
Les Modifications Du TAM En Réponse A Une Inflammation Colique Expérimentale	100
Mise En Place Et Description D'un Modèle Murin De Creeping-Fat.	107
Implication Du CF Dans La Physiopathologie De La MC	111
PARTIE 4 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Anti Gène
AG	Acide Gras
AGL	Acide Gras Libre
AMPc	Adenosine MonoPhosphate cyclique
AMPK	Adenosine MonoPhosphate kinase
ARNm	Acide Ribonu Nucléique messenger
ASA	AminoSalicylés
ATGL	Adipose TriGlyceride Lipase
CARD	Caspase Activating Recruitment Domain
CCL	C-C Chemokine Liguand
CCR	C-C chemokine Receptor
CD	Cellule Dendritique
CF	Creeping-Fat
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
DAG	Diglycérole
DNBS	DiNitro Benzène Sulfonique
DSS	Dextran Sulfate Sodium
FOS	Frocto OligoSaccharides
FSV	Fraction Stroma Vasculaire
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
HBD	Human Beta Défensine
HD	Human Défensine
HNP	Human Neutrophile Peptide
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IRM	Image à resonance magnétique
JAM	Junction Adhesion Molecule
KO	Knock-out

LB	Lymphocyte B
LHS	Lipase Hormono-Sensible
LMG	Lipase des MonGlycérides
LPL	LipoProtéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
MAP	Mucobacterium Avium sp Paratuberculosis
MC	Maladie de Crohn
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protéine 1
MDP	MuramylDiPeptid
MI	Mico-inflammatoire
MICI	Maladie Intestinale Chronique de l'Intestin
MLC	Myosin Light -chain
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase
MPO	Myéloperoxidase
TGFβ	Tumor Growth Factor β
MUC	Mucine
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NI	Non-Inflammatoire
NK	Natural Killer
NOD é	Nucleotid binding Oligomerization Domain 2
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
Pref-1	Préadipocyte factor 1
PRR	Pattern Recognising Receptor
RCH	Recto Colite Hémorragique
SLM	Score Lésionnel Macroscopique
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TA	Tissu Adipeux
TAM	Tissu Adipeux Mésentérique
TAP	Tissu Adipeux Péri-gonadique
TASC	Tissu Adipeux Sous-Cutané

TAV	Tissu adipeux viscéral
TG	Triglycérides
TLR	Toll Like Receptor
TNBS	TriNitro Benzène Sulfonique
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
UFC	Unité Formant des Colonies
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO	Zonula Occludens

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Phénotypes clinico-pathologiques de la MC (A) et de la RCH (B).	15
Figure 2. Manifestations extra-intestinales des MICI.	17
Figure 3. Caractéristiques anatomo-pathologiques des MICI.	18
Figure 4. Illustration de la différenciation des cellules du système immunitaire	28
Figure 5. Les TLR et leurs ligands ; activation de la voie NFkB	29
Figure 6. La différenciation en macrophage	32
Figure 7. Représentation en roue des trois populations de macrophages existantes	34
Figure 8. Interaction entre les macrophages et les cellules T.	35
Figure 9. La réponse B thymo-dépendante.	36
Figure 10. La différenciation des lymphocytes auxiliaires.	39
Figure 11. Les Balances immunitaires Th1/Th2 et Th17/Treg	40
Figure 12. Eléments composants la barrière intestinale.	41
Figure 13. Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle.	44
Figure 14. Représentation de la barrière de mucus dans le côlon de souris.	48
Figure 15. Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires intestinales.	49
Figure 16. Représentation schématique des jonctions serrées et des protéines les constituant au niveau intestinal.	50
Figure 17. Le système immunologique intestinal au niveau de l'intestin grêle et du côlon.	54
Figure 18. Schématisation du déséquilibre des populations lymphocytaire effectives Th1 et Th2 au cours des MICI.	55
Figure 19. Interaction entre le système immunitaire et la régulation de la barrière intestinale.	57
Figure 20. Schéma d'un adipocyte.	65
Figure 21. Profil de distribution des dépôts adipeux chez l'homme : profil poire/pomme	69
Figure 22. Schématisation des étapes de la lipolyse	72
Figure 23. Implication des sécrétions du TA dans plusieurs processus physiologiques.	72
Figure 24. Sécrétions du TA impliquées dans l'inflammation	78
Figure 25. Effet de la leptine sur les macrophages et monocyte	79
Figure 26. Effet de l'adiponectine sur les monocytes et macrophages.	81
Figure 27. Implication de la leptine et de l'adiponectine dans la mise en place de la réponse Th1 ou Th2.	81
Figure 28. Mise en place au niveau du TA d'un « cross-talk » entre les adipocytes et les macrophages du TA.	84
Figure 29. Aspect histologique du TA chez les sujets Crohn en comparaison au TA de sujets sains.	86
Figure 30. Le creeping fat dans un cas d'iléite de Crohn.	87
Figure 31. Obtention et caractérisation d'une colite « modérée » ou « sévère ».	99
Figure 32. Interrelation bidirectionnelle entre le tissu adipeux mésentérique et la barrière intestinale.	106
Figure 33. Comparaison entre le « CF-like » et le TA péri-tumoral dans le cancer du sein.	110
Figure 34. Effet des sécrétions du CF en fonction du statut inflammatoire des tissus intestinaux.	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Symptomatologie des MICI.	20
Tableau 2. Récapitulatif des caractéristiques des MICI retrouvées dans les modèles murins.	63
Tableau 3. Expression des différents sous-types de TLR dans les différents dépôts adipeux, chez l'homme ou dans des modèles murins.	83
Tableau 4. Tableau comparatif de l'expression de la leptine, de l'adiponectine, de l'IL-6 et du TNFα au niveau plasmatique, du TAV et du CF chez l'homme et dans les modèles animaux de colite.	89

PARTIE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I :

ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

I. Généralités, historique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) désignent des lésions inflammatoires, d'étiologie peu connue, atteignant le tractus digestif. Ces atteintes sont définies par des manifestations cliniques variées et souvent, comme leur nom l'indique, en évolution chronique, c'est à dire avec une succession de phases de rémissions et de poussées de la maladie. Les lésions inflammatoires sont secondaires à une activation du système immunitaire intestinal en amont duquel l'implication de facteurs environnementaux (mode de vie, flore intestinale, virus) et génétiques (predisposition héréditaire) commence à être mieux connue. La maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI.

La MC fut découverte par Fabry en 1623 et décrite pour la première fois par Antoni Lesniowski en 1904. En 1932, après avoir décrit 14 cas d'une affection alors appelée « iléite terminale ou régionale » et localisée à la moitié terminale de l'iléon, le gastro-entérologue Burrill Crohn, donna son nom à cette pathologie. La RCH fut, elle, différenciée de la dysenterie bactérienne en 1859 par Samuel Wilks puis décrite par Arthur Hirst en 1931.

Bien que la MC et la RCH présentent un phénotype clinico-pathologique similaire, ces deux pathologies diffèrent par la localisation de l'inflammation dans le tube digestif, et la nature des atteintes histologiques.

II. Epidémiologie

Avec 200.000 personnes atteintes de MICI en France dont 120.000 de MC et 80.000 de RCH, les MICI sont considérées comme des maladies rares. Entre 5.000 et 6.000 nouveaux cas sont observés chaque année en France. Les incidences les plus hautes sont rapportées en Europe du nord et en Amérique du nord où elles sont de 12 à 19/100000/an et de 5 à 29/100000/an, pour

la MC et la RCH respectivement. Ainsi, près de 1,4 millions d'Américains et 2,2 millions d'Européens souffrent de MICI [1].

Depuis une cinquantaine d'années, le nombre de cas a été multiplié par 10, essentiellement dans les pays industrialisés ou nouvellement industrialisés comme la Chine [2]. Cette forte augmentation plaide en faveur d'une influence environnementale et sociétale dans le développement des MICI [3].

Les MICI touchent aussi bien les hommes que les femmes. Cependant, la prévalence de la MC montre une discrète prépondérance chez la femme alors qu'aucune différence n'est observée suivant le sexe dans le développement d'une RCH.

L'incidence des MICI en fonction des différentes tranches d'âge paraît uniforme dans la plupart des études de la première enfance à 70 ans (www.afa.asso.fr). L'incidence maximale est retrouvée chez le jeune adulte entre 20 et 35 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic de la MC est de 27 ans et en moyenne de 10 ans inférieur à celui de la RCH (www.afa.asso.fr).

III. Etiologie

L'étiopathogénèse des MICI reste encore méconnue. Les manifestations cliniques et les données épidémiologiques étant très hétérogènes, cela plaide en faveur d'une étiologie multifactorielle mettant en jeu aussi bien des facteurs génétiques, immunologiques ou encore environnementaux. L'implication de la flore intestinale et de l'immunité sera discutée ultérieurement dans le chapitre III.

III.1. Les facteurs génétiques

L'hypothèse génétique repose sur la prédisposition héréditaire de certaines populations à développer la maladie. En effet, chez les patients atteints de MICI, 10 à 29% d'entre eux présentent un antécédent familial, c'est-à-dire un parent atteint de la même pathologie [4]. Ces analyses d'agrégation familiale indiquent que le risque de développer une MC ou une RCH au sein d'une population apparentée est respectivement de 20-35 et 8-15 fois supérieur à la moyenne en comparaison à une population témoin [5]. Les données issues du séquençage du génome humain ont permis de mettre en évidence des haplotypes spécifiques des MICI [6] permettant d'établir une carte chromosomique des MICI présentant les loci les plus

solidement associés aux MICI au niveau des chromosomes 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16 et 19. Ces loci ont été nommés IBD 1 à 26.

Sur le locus IBD 1, le gène NOD2/CARD15 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain/Caspase-Activating Recruitment Domain15), a été identifié comme un gène de prédisposition aux MICI et plus particulièrement à la MC [7]. NOD2/CARD15, est un récepteur cytoplasmique impliqué dans l'immunité innée en réponse au muramylpeptide (MDP), un composant du peptidoglycane des parois bactériennes. Ce gène est majoritairement exprimé par les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques) mais aussi par les cellules épithéliales et les cellules de Paneth [8, 9]. Trois mutations majeures du gène ont été décrites [10]. Suivant les études, une mutation du gène NOD2 est retrouvée chez 10 à 50% des patients atteints de la MC [11]. Le risque de développer cette maladie est accrue d'un facteur 2 à 4 pour une personne hétérozygote et d'un facteur de 20 à 40 pour une personne homozygote. Le mécanisme par lequel les mutations de NOD2 entraînent une telle augmentation du risque reste encore inconnu.

Le gène codant le récepteur à l'IL-23 (IL23R) situé sur le locus IBD-17 sur le chromosome 1 a également été proposé comme gène candidat. L'IL23 est une cytokine pro-inflammatoire qui régule la réponse innée des macrophages et des cellules dendritiques. Plusieurs polymorphismes (R381Q, A381G, L310P) de l'IL23R ont été décrits dans les MICI [12, 13] mais entraînent des répercussions négatives dans la MC et positives dans la RCH [14].

Cependant, de nombreuses observations épidémiologiques et la concordance monozygotique imparfaite chez les jumeaux, démontrent que l'existence de prédispositions génétiques ne suffit pas à expliquer le développement des MICI [15, 16], suggérant l'implication d'autres facteurs comme par exemple les facteurs environnementaux dans l'étiogénèse des MICI.

III.2. Les facteurs environnementaux

L'incidence des MICI est plus importante dans les pays industrialisés ou en voie de développement et dans les pays du Nord, que dans les pays Sud [17, 18]. L'hypothèse d'une meilleure hygiène dans les pays du Nord que dans les pays du Sud [19] est souvent proposée pour expliquer le gradient Nord/Sud. Toutefois, cette hypothèse s'applique mieux à la MC qu'à la RCH, ce gradient étant moins marqué pour cette dernière [17]. Cette hypothèse suggère qu'un excès d'assainissement limite le niveau d'exposition aux antigènes environnementaux et perturbe la maturation fonctionnelle du système immunitaire muqueux et l'induction de la tolérance immunitaire. Ces perturbations instaurent alors une réponse

immunitaire inappropriée lors de la réexposition aux antigènes environnementaux au cours de la vie. En effet, les MICI sont quasiment inexistantes au sein des populations en contact permanent avec des bactéries et des parasites potentiellement pathogènes. De plus, des différences d'incidences sont observées dans certaines populations migrantes, avec par exemple une augmentation du nombre de cas de MICI dans les populations asiatiques migrant en Europe et, inversement, une diminution dans les populations européennes migrant en Asie [20]. Toutes ces observations mettent en cause les facteurs environnementaux, culturels mais également alimentaires dans le développement des MICI.

Parmi ces facteurs environnementaux potentiels, seul le tabagisme est universellement reconnu. Le tabagisme affecte de manière différente le risque d'apparition des MICI [21]. Le tabagisme actif augmente le risque de développer une MC et aggrave l'évolution de la maladie surtout chez les femmes : sévérité de la récurrence chirurgicale, complications perforantes sévères de type abcès ou fistules [22]. Le tabagisme passif au cours de l'enfance pourrait lui aussi augmenter l'incidence de MC chez l'adulte. A l'inverse, il existe un effet protecteur du tabagisme vis-à-vis de la RCH, non seulement chez les fumeurs actifs mais aussi chez les fumeurs passifs [22].

Le rôle du stress est souvent évoqué par les patients. Le stress psychologique a été décrit comme un facteur aggravant de l'activité inflammatoire dans les MICI [23, 24]. Ainsi, des événements de vie traumatisants, comme un deuil ou une séparation et induisant un stress chronique ou un état dépressif, augmenteraient la probabilité de rechute chez les patients en rémission [25]. Une des difficultés inhérente à cette recherche de l'impact du stress sur les MICI est que les mêmes événements de vie ne sont pas vécus de la même manière selon les individus. De manière intéressante la relation entre le stress et les MICI peut être décrite comme bidirectionnelle. En effet, le stress peut être un facteur déclenchant des MICI, et les MICI elles-mêmes en détériorant la qualité de vie des patients peuvent entraîner un état d'anxiété et de dépression chez ces derniers [26].

III.3. Facteurs infectieux

Les similitudes entre les MICI et certaines formes d'entérocolites infectieuses initiées par des espèces bactériennes non commensales (*Campylobacter*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter spp.* ou *Yersinia spp.*) suggèrent que des agents infectieux au tropisme intestinal participent à l'étiologie des MICI. Cette hypothèse est étayée par les données

épidémiologiques qui associent l'usage excessif d'antibiotiques et la modification du mode de vie alimentaire et sanitaire à une évolution de la composition de la flore digestive [27].

Il est également rapporté qu'une infection par le virus de la rougeole lors des premiers jours de la vie [28, 29], voire avant, lors du dernier trimestre de grossesse [30], pourrait jouer un rôle dans l'apparition 20 ou 30 ans plus tard d'une MC. Les recherches virologiques sont donc en pleine évolution.

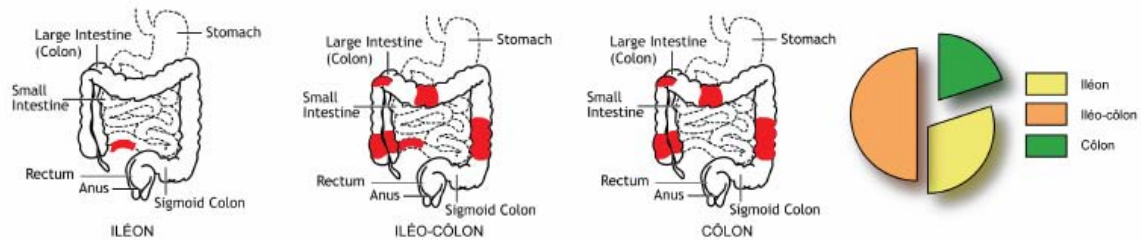
Mycobacterium avium ssp paratuberculosis (MAP) est une bactérie entraînant une inflammation gastro-intestinale, la maladie de Johne. Cette pathologie partage de nombreuses similarités épidémiologiques, cliniques et pathologiques avec la MC. Pour exemple, la présence de « creeping-fat », tissu caractéristique de la MC et retrouvé autour des zones inflammatoires de l'intestin, est également retrouvé chez les animaux atteints de la maladie de Johne [31]. Cette bactérie est retrouvée au niveau iléal et plasmatique chez les patients atteints de MC [32, 33]. La transmission à l'homme peut s'expliquer par la présence de MAP dans le lait de vache, dans le lait maternel de femmes atteintes de MC, l'eau potable, ou encore par l'ingestion de viande crue [34-36]. Cependant l'implication de la MAP dans l'étiogénèse de la MC reste encore débattue.

IV. Classification clinique

Anatomiquement, la MC peut toucher l'ensemble du système digestif de la bouche à l'anus. Cependant, dans la majorité des cas, l'inflammation est principalement localisée au niveau de l'iléon ou du côlon. Dans quelques cas (4%), une inflammation de l'œsophage et de l'estomac a été décrite. En fonction du site de l'inflammation, trois grandes classes de MC, de prévalence différente, sont décrites : (1) l'iléite de Crohn uniquement localisée au niveau de l'iléon (28%), (2) la MC iléo-colique qui atteint à la fois l'iléon terminal et le gros intestin (47%), et (3) la colite de Crohn qui ne concerne que le gros intestin (21%) (Figure 1) [37].

La RCH, est une inflammation restreinte au niveau recto-colique. La localisation anatomique de l'inflammation permet d'établir trois phénotypes clinico-pathologiques de la RCH: (1) La pancolite où l'inflammation atteint la totalité du côlon, (2) la rectocolite gauche où l'inflammation atteint le côlon, de la flexure gauche au rectum et (3) la recto-sigmoïdite où l'inflammation se situe au niveau du rectum et du côlon sigmoïde (Figure 1) [37].

A. MALADIE DE CROHN



B. RECTO-COLITE HEMORRAGIQUE

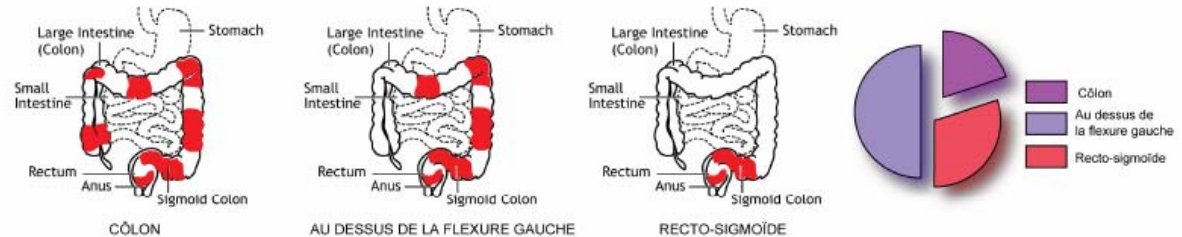


Figure 1. Phénotypes clinico-pathologiques de la MC (A) et de la RCH (B).

En fonction de la localisation de l'atteinte inflammatoire, on distingue plusieurs types de MC et de RCH dont les prévalences sont différentes (diagrammes circulaires).

V. Symptômes

V.1. Signes cliniques

Les manifestations cliniques des MICI sont majoritairement digestives, les symptômes les plus fréquents étant les douleurs abdominales et de la diarrhée. La distinction est souvent faite entre manifestations intestinales et extra-intestinales. Aucun de ces symptômes n'est réellement spécifique des MICI, ce qui complique le diagnostic.

Manifestations intestinales :

Le principal symptôme des MICI est la présence de douleurs de type crampes abdominales. Ces douleurs sont souvent situées dans les zones sténosées de l'intestin et ne sont pas soulagées par la défécation. Variant dans leur siège et leur intensité, elles sont très fréquentes au cours des phases de poussées de la maladie. Elles peuvent s'accompagner de vomissements et de diarrhées chroniques quelquefois sanglantes. Les autres symptômes intestinaux sont les ballonnements, les flatulences, l'hématochézie (hémorragie anale), l'inconfort anal (douleur, démangeaisons, abcès, fistule, fissure), l'incontinence fécale, la présence d'ulcères aphteux buccaux et les douleurs oesophagiennes et abdominales hautes.

Manifestations extra-intestinales :

Les MICI présentent de nombreuses manifestations extra-intestinales de type ostéo-articulaires, hépato-biliaires, oculaires ou encore cutanées (Figure 2) [38]. Entre 21 et 40% des patients atteints d'une MC ou d'une RCH développent des manifestations ou des complications extra-intestinales (Figure 2). La prévalence de ces manifestations est supérieure dans la MC en comparaison à la RCH.

Les manifestations articulaires sont retrouvées chez 16 à 33% des patients atteints de MICI. On peut distinguer les rhumatismes périphériques touchant les articulations des membres (genoux, cheville, épaules, coudes et poignets), des rhumatismes axiaux qui concernent la colonne vertébrale et le bassin [39]. Les poussées de rhumatismes périphériques sont associées aux poussées évolutives de la MC.

L'érythème noueux et le *Pyoderma gangrenosum* sont les deux manifestations cutanées les plus associées aux MICI. Trois à 12% des patients développent ce type de symptômes extra-intestinaux. Le plus fréquent est l'érythème noueux et plus particulièrement dans la MC. Il apparaît sous forme de nodosités sensibles, rouges-violacées siégeant sous la peau au niveau des jambes ou des avant-bras [39].

Les manifestations oculaires sont également associées aux phases de poussées de la pathologie. Elles sont présentes chez 3% des patients atteints de MICI et préférentiellement au cours d'une RCH que d'une MC [39]. Ces manifestations peuvent entraîner une douleur à la lumière, une inflammation de l'iris ou n'être détectées qu'au cours d'un examen ophtalmologique.

Les manifestations hépato-biliaires sont latentes, c'est à dire qu'elles n'entraînent aucun signe clinique. Elles se caractérisent par une stéatose ou des anomalies des petits canaux biliaires. Parmi elles, il existe la cholangite sclérosante primitive, pour laquelle 2/3 des cas en France sont associés aux MICI et principalement à la RCH [40].

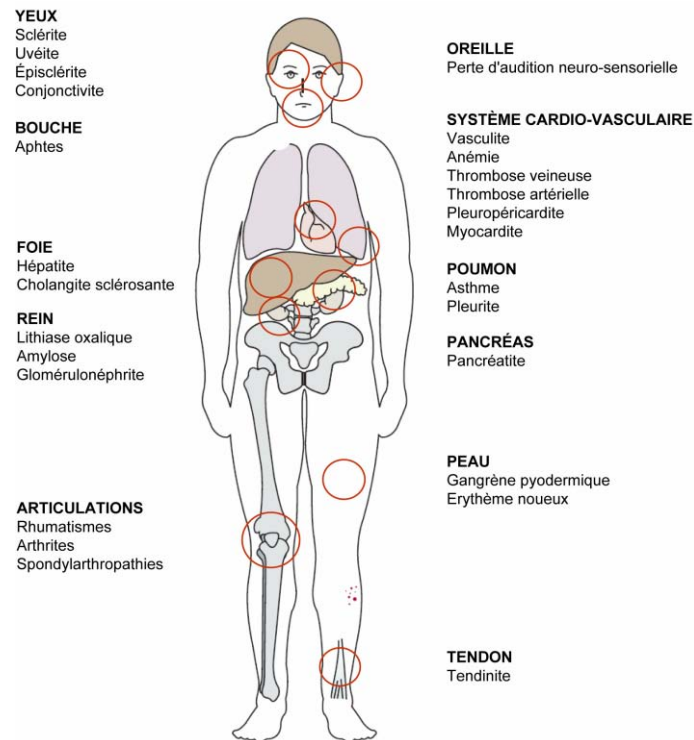


Figure 2. Manifestations extra-intestinales des MICI.
D'après [37]

V.2. Signes anatomo-pathologiques

Les biopsies, les techniques d'endoscopie et d'imagerie (radiographie, imagerie par résonance magnétique IRM, ultrasons) ont permis de décrire les atteintes anatomiques et histologiques des patients présentant une MICI [37].

La MC provoque des lésions profondes, souvent trouvées en alternance avec des zones saines. Ces lésions sont dites transpariétales, puisque l'ensemble des différentes couches composant la paroi digestive peut être touché [41]. Dans la MC, la muqueuse est friable et érythémateuse avec une perte de vascularisation et une hyperplasie lymphoïde dans l'iléon terminal. Au niveau du côlon, des ulcérations et des abcès sont observables. L'inflammation transmurale est associée au développement d'agrégats lymphoïdes et de granulomes (Figure 3). Ces lésions ont pour conséquences la formation de sténoses (rétrécissement de la lumière dû à l'épaississement de la paroi épithéliale) ou encore des fistules (conduit anormal faisant communiquer une cavité ou un organe avec un autre ou avec l'extérieur de l'organisme) montrant l'extension de l'inflammation aux tissus avoisinants.

La MC est également caractérisée par l'hypertrophie du tissu adipeux mésentérique et par la présence d'un tissu ectopique d'aspect adipo-fibreux, entourant les zones atteintes de l'intestin. Ce tissu est couramment appelé « creeping-fat ».

La RCH engendre des lésions superficielles et hémorragiques atteignant la muqueuse [41] et la sous-muqueuse, souvent en région continue. Ces lésions entraînent le plus souvent des abcès au niveau des cryptes définis par une accumulation de neutrophiles et de monocytes à la base des villosités aboutissant à la destruction des sites importants dans le renouvellement des cellules souches épithéliales. De plus, le côlon est faiblement vascularisé et peut présenter des ulcérations très nombreuses, souvent aphtoïdes ou profondes (fissures), des pseudo-polypes et des hémorragies (Figure 3).

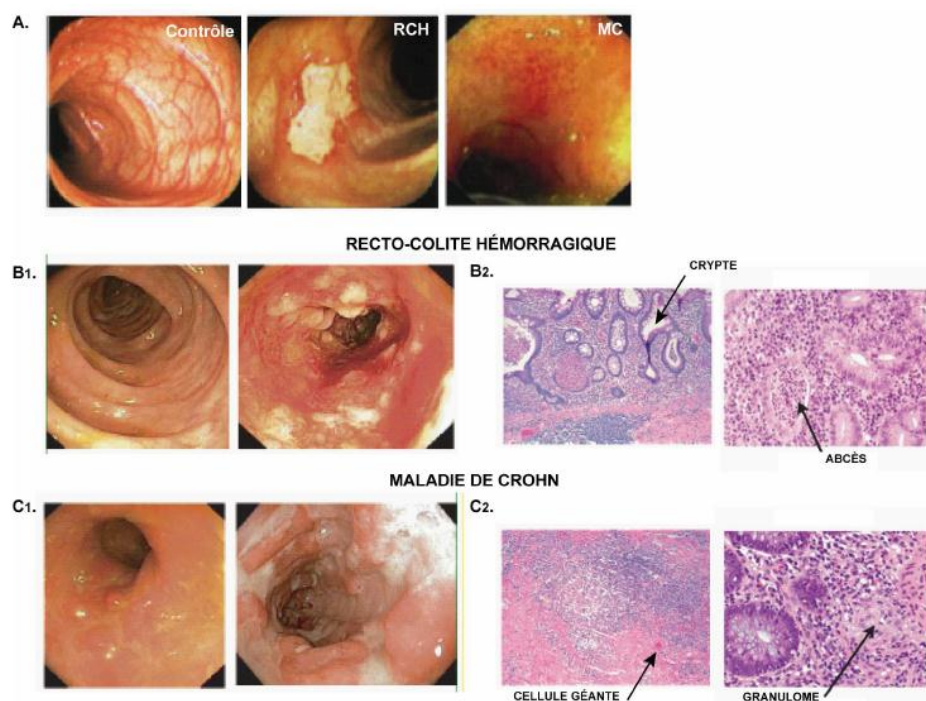


Figure 3. Caractéristiques anatomo-pathologiques des MICI.

Adapté de [37, 42]. L'endoscopie révèle des atteintes de la muqueuse colique chez les patients par rapport à des individus sains (A), caractérisées par une pan-colite avec des ulcérations et des polypes dans la RCH (B1) et par un amincissement de la muqueuse et des hyperplasies dans la MC (C1). La coloration des biopsies par hématoxyline-éosine montre une désorganisation de la muqueuse et la présence d'abcès dans la RCH (B2) ainsi que des granulomes dans la MC (C2).

V.3. Complications intestinales

Parmi ces nombreuses complications on peut citer les abcès, les fistules, le risque d'occlusion intestinale du aux sténoses ainsi que les hémorragies digestives. Outre les complications

associées aux MICI, ces pathologies induisent aussi l'activation de cellules infiltrantes (comme les leucocytes) qui vont libérer des médiateurs responsables de dommages à l'ADN et modifier les signaux de croissance cellulaire, deux processus associés à une mauvaise restructuration de l'épithélium et donc au développement de cancers. La RCH et la MC présentent en effet un risque accru de développer un cancer colorectal (CCR), d'adénocarcinomes du grêle (pour la MC uniquement) et de cancers extra-intestinaux (cholangiocarcinomes, lymphomes non hodgkiniens), risque qui s'ajoute aux effets secondaires carcinogènes des traitements médicamenteux des MICI. Ainsi, les malades atteints de MICI ont, par rapport à la population générale, un risque 5 fois supérieur de développer un CCR. Ce risque est modulé par la durée de l'évolution de la maladie et l'étendue de l'atteinte colique. Ainsi, dans la rectocolite, le risque de cancer est d'environ 2% après 10 ans d'évolution, 8% après 20 ans et 18% après 30 ans [43].

Aucun symptôme ni aucun test biologique ne permet de diagnostiquer la MC ou la RCH avec certitude. L'entretien avec le patient et l'examen physique sont indispensables et complétés par la recherche d'indices anatomopathologiques grâce aux techniques d'explorations anatomique et fonctionnelle (coloscopie, scanner ou IRM). Avant l'entreprise d'examens invasifs et coûteux, le diagnostic différentiel permet d'écarter certaines pathologies dont les symptômes sont similaires à ceux des MICI.

L'ensemble des caractéristiques symptomatologiques de la MC et de la RCH est reproduit dans le Tableau 1.

Symptomatologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin		
Symptôme	Maladie de Crohn	Recto-colite hémorragique
Site		
Rectum	Parfois	Oui
Côlon	2/3 des patients	Oui
Iléon	2/3 des patients	Non
Jéjunum	Rare	Non
Estomac ou duodénum	Rare	Non
Œsophage	Rare	Non
Caractéristiques cliniques		
Âge moyen de survenue	Entre 20 et 40ans ; parfois chez l'enfant	Entre 30 et 50ans
Constipation	Parfois	Perte du péristaltisme
Diarrhée	Commun	Oui
Douleur abdominale	Commun	Parfois
Hémorragies rectales (hématochezie)	Rare	Commun
Atteinte de l'intestin grêle	Commun	Non (sauf en cas d'iléite rétrograde)
Obstruction de l'intestin grêle	Commun	Rare
Obstruction colique	Commun	Rare
Atteinte péri-anale	Commun	Non
Passage de mucus ou de pus dans les selles	Rare	Commun
Présence d'une masse abdominale	Commun	Rare
Fièvre	Commun	Commun
Perte de poids	Commun	Commun
Retard staturo-pondéral chez l'enfant et l'adolescent	Commun	Parfois
Signes de malnutrition	Commun	Commun
Manifestations extra-intestinales	Commun	Commun
Effet aggravant du tabac	Oui	Non
Complications intestinales		
Sténose	Commun	nr
Fistule	Commun	Non
Colectasie (mégacôlon toxique)	Non	nr
Perforation	Rare	nr
Cancer	Commun	Commun
Hémorragie	Rare	Profuse
Endoscopie et radiologie		
Distribution	Discontinue et segmentée	Continue
Ulcération	Profonde avec extension transmurale	Fine et superficielle
Erythème muqueux	Parfois	Oui
Fissures	Commun	Rare
Strictures ou fistules	Commun	Rare
Pseudopolypes	Commun	Commun
Implication iléale	Etroite et nodulaire	Dilatation
Caractéristiques anatomo-pathologiques		
Inflammation mucosale transmurale	Oui	Non
Inflammation séreuse	Oui	Parfois
Architecture des cryptes intestinales déformée	Rare	Oui
Cryptite et abcès cryptiques	Oui	Oui
Granulomes épithélioïdes	Oui	Non
Friabilité de la muqueuse	Parfois	Commun
Épaisseur de la sous-muqueuse	Augmentée	Diminuée
Altération de la muco-sécrétion	Parfois	Commun
Lymphangiectasie	Oui	Non
Hyperplasie neuronale	Oui	Non
Hyperplasie lymphoïde	Diffuse	Focale
Métaplasie des cellules de Paneth	Oui	Parfois

Tableau 1.Symptomatologie des MICI.
D'après [37, 41, 44-46].

VI. Traitements des MICI

VI.1. Les traitements pharmacologiques

Les antibiotiques : L'effet bénéfique d'une action sur la flore colique est retrouvé dans les protocoles cliniques qui montrent que les antibiotiques sont utiles dans le traitement de certains sous-groupes de patients atteints de la MC [47]. En particulier, le métronidazole est efficace pour les patients dont le tableau clinique présente des atteintes coliques ou des fistules péri-anales, mais des doses importantes (jusqu'à 750mg, 3 fois/jour) sont nécessaires et potentiellement neurotoxiques. La ciprofloxacine et la clarithromycine pourraient être utilisées alternativement au métronidazole. De façon contrastée, l'usage des antibiotiques dans le traitement de la RCH est très limité [48].

Les 5-aminosalicylés ou 5-ASA : Les aminosalicylés sont des molécules de synthèse dérivées de l'acide salicylique qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. En raison de son efficacité, le 5-ASA est utilisé dans 60 à 70% des cas de RCH. En effet, cette molécule possède une bonne tolérance et entraîne peu d'effets secondaires (nausées, diarrhées). L'action bénéfique des 5-ASA est liée à ses caractéristiques anti-inflammatoires, comme l'inhibition de la production des prostaglandines et des leucotriènes, du chimiotactisme des neutrophiles et de l'activation du facteur de transcription NFκB, ainsi que de la capture des espèces réactives de l'oxygène. Cependant, ce traitement n'a que peu d'efficacité dans le cas de la MC.

Les corticostéroïdes : Le traitement des MICI utilise les propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes naturels (cortisone, hydrocortisone ou cortisol) [49] et des glucocorticoïdes de synthèse. Ce sont des anti-inflammatoires stéroïdiens qui agissent sur la synthèse des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, histamine et prostaglandines) par l'intermédiaire d'une inhibition de la production de l'acide arachidonique. Quel que soit le mode d'administration, l'efficacité est le plus souvent rapide et marquée par l'amélioration de l'état général et de l'appétit ainsi que par la régression des douleurs. Cependant, leur administration entraîne de nombreux effets secondaires comme la fièvre, l'hépatite, la pancréatite aiguë, et très rarement le développement de lymphome cérébral. Ils sont prescrits en deuxième intention, notamment dans le cas d'inefficacité du traitement aux aminosalicylés ou en période de poussée sévère.

Les immunosuppresseurs : Le méthotrexate, l'azathioprine et son produit métabolique la 6-mercaptopurine sont des agents de la classe des anti-métabolites, utilisés essentiellement dans le traitement de certains cancers et dans les maladies auto-immunes. Ils ne sont efficaces qu'après plusieurs semaines de traitement. Leur activité immunosuppressive réduit la prolifération lymphocytaire par l'interférence avec la synthèse des acides nucléiques purinergiques. Ces composés nécessitent une surveillance régulière car ils sont toxiques et favorisent les infections opportunistes et les lymphomes.

Les biothérapies ciblées: Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire dont la concentration est fortement augmentée au niveau de la muqueuse intestinale et des selles des patients atteints de MICI [50, 51]. L'infliximab, l'adalimumab et le certolizumab pégylé sont les anticorps monoclonaux anti-TNF α les plus utilisés. Ces anticorps sont synthétiques (chimérique pour l'infliximab : 75% humain et 25 % murin ; ou 100% humain pour l'adalimumab). Ce traitement concerne 10% des patients et est très utilisé en cas d'échecs thérapeutiques avec les traitements énumérés précédemment ou face aux formes sévères. Bien que ces anticorps permettent un contrôle efficace des poussées et un maintien des rémissions [52], cette thérapie comporte certains risques comme le développement d'allergie, de tuberculose, de pneumonie, d'insuffisance cardiaque, d'hépatite, de maladies neurologiques démyélinisantes ou encore de lymphome. Les anticorps anti-TNF α présentent donc une forte toxicité, et l'efficacité du traitement peut être réduite par la formation d'auto-anticorps chez le patient [53].

Les médicaments diminuant l'intensité de la réponse cellulaire du système immunitaire sont très utilisés dans les MICI. La ciclosporine et le tacrolimus bloquent la prolifération des cellules T et la transcription du gène IL-2. Ils sont utilisés comme traitement d'entretien de la MC et plus rarement de la RCH. Leur utilisation est délicate en raison d'une mauvaise compliance liée à un délai d'action de plusieurs mois avant leur pleine efficacité et en raison de leur toxicité.

Stratégie thérapeutique :

Les options thérapeutiques varient en fonction de la nature, la localisation, la sévérité et l'évolution de la MICI. Les doses, la voie d'administration ou l'association des médicaments entre eux ou avec d'autres modalités thérapeutiques non médicamenteuses (nutrition ou chirurgie), seront des facteurs décisifs dans l'efficacité du traitement [54].

Il existe deux stratégies thérapeutiques distinctes : la première vise à traiter la phase active et les épisodes de poussées dans le double but de réduire la durée de ces phases et d'induire une rémission de la maladie. La deuxième est une stratégie « d'entretien », dont le but est de maintenir la phase de rémission et de prévenir la récurrence des poussées (maintien de la rémission par un traitement de fond). Ces deux stratégies comportent des traitements de première intention et, en cas d'échec, un traitement de deuxième intention est mis en place.

Schématiquement, l'induction de la rémission est assurée, en première intention, par les aminosalicylés, utilisés dans 70% des cas de RCH. Ayant une efficacité accrue, mais provoquant de nombreux effets secondaires, les corticostéroïdes sont utilisés en deuxième intention.

Le traitement d'entretien est lui aussi basé en première intention sur l'utilisation des aminosalicylés, permettant de diminuer la fréquence des rechutes, ainsi que sur l'utilisation d'antibiotiques. Ce traitement est éventuellement complété en deuxième intention par des anti-métaboliques et des anticorps anti-TNF α .

VI.2. Les traitements d'appoint

Une des caractéristiques des MICI étant le dérèglement de la flore microbienne, avec le plus souvent une balance en faveur d'une flore pathogène, les pré- et probiotiques sont utilisés en traitement d'appoint. L'intérêt de ces composants est essentiellement d'augmenter la durée des épisodes de rémission.

Les probiotiques :

Des patients atteints de MC active traités avec un mélange de bactéries commensales VSL#3® ont une réponse thérapeutique positive, apparemment sans effet systémique indésirable [55]. Le mélange VSL#3® (VSL#3/Questcor) est composé majoritairement de *S. thermophilus* mais contient aussi *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis* dans une moindre mesure et *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* et *L. bulgaricus* dans de faibles proportions. Le mécanisme d'action hypothétique est le rééquilibrage des populations bactériennes et la régulation du système immunitaire intestinal. Le mélange VSL#3® a également un effet bénéfique dans le traitement de la RCH [56] pour laquelle la bactériothérapie fécale via des instillations rectales a aussi montré des résultats encourageants [57]. Les probiotiques *Lactobacillus GG* (Culturelle®; ConAgra Functional Foods) et *Saccharomyces boulardii* (Florastor®; Biocodex) ont été étudiés par l'industrie pharmaceutique mais les données sont équivoques [58-60].

Les prébiotiques :

Les prébiotiques sont des glucides ou hydrates de carbone complexes comme les fructo-oligosaccharides (FOS) qui résistent à la digestion dans l'intestin grêle et constituent le substrat préférentiel de certaines bactéries commensales (en général, le genre *Bifidobacteria*). Les prébiotiques permettent la croissance et la prolifération de ces bactéries et peuvent modifier l'environnement intestinal, par exemple en acidifiant le pH colique. Les données cliniques restent limitées mais une étude pilote chez des malades atteints de MC a montré que l'ingestion quotidienne de FOS pendant trois semaines augmentait la concentration de bifidobactéries fécales tout en diminuant l'activité inflammatoire de la maladie. Les acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate) issus du métabolisme des oligosaccharides prébiotiques sont les principaux carburants du colonocyte et ont des effets trophiques et anti-inflammatoires sur le côlon adulte [61]. Les fibres alimentaires pourraient donc exercer un effet protecteur vis-à-vis des MICI en augmentant la production colique de ces acides gras [62, 63].

VI.3. La chirurgie

La MC ne peut être guérie par la chirurgie. L'acte chirurgical s'impose en cas de complications telles que sténoses, fistules ou cancers. La chirurgie n'est en aucun cas un traitement de première intention, mais bien au contraire un traitement qui s'impose par l'échec des traitements pharmacologiques. Dans les deux années suivant le diagnostic d'une MC, 45% des patients vont subir une intervention chirurgicale et 90% vont subir une résection chirurgicale au moins une fois au cours de l'évolution de leur maladie. La chirurgie se limite alors aux parties les plus atteintes de l'intestin, mais l'exérèse de ces segments ne protège pas des récives et plus particulièrement sur les lieux mêmes de la résection.

Dans le cas de la RCH, la chirurgie est réalisée dans les formes suraiguës comportant des évolutions chroniques mal contrôlées ou des formes anciennes avec un risque aggravé d'évoluer vers des formes de dégénérescence maligne. La colectomie totale peut dans certains cas de RCH être totalement curative, mais elle engendre d'importants inconvénients et un risque de complication, en particulier la pochite [64].

VI.4. Les futures cibles thérapeutiques

A l'heure actuelle, de nombreux traitements reposant essentiellement sur une thérapie ciblée sont en cours d'évaluation. La modulation de l'expression de cytokines impliquées dans la pathologie par l'administration d'anticorps anti-IL-12/IL-23, anti IL-17, anti IL-6 reçoit un intérêt grandissant.

L'IL-12 est une cytokine clé de la réponse inflammatoire dans la MC, et son expression élevée dans l'intestin de patients est corrélée à l'expression de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IFN}\gamma$ [65, 66]. C'est un hétérodimère constitué de deux sous-unités p40 et p35 [67]. L'IL-12 et l'IL-23 partagent la même sous-unité p40 et l'activité biologique de l'IL-23 est également inhibée par l'anticorps anti IL-12 dirigé contre la sous-unité p40. L'expression de l'IL-23 est augmentée dans la MC, et participe à l'inflammation en induisant l'expression d'IL-6 et d'IL-17, orientant la réponse lymphocytaire vers une réponse de type Th17 [68]. Actuellement deux anticorps monoclonaux dirigés contre la sous unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23, ont été développés ; l'ABT-874 (Abbott) et le CNTO1275 (Ustekinumab, Centocor). Les premières études menées chez des patients atteints de MC montrent une efficacité importante de ces anticorps spécifiques. Le traitement à l'ABT-874 induit une réponse dans 75% des cas contre 25% dans le groupe placebo [69]. De la même manière, les patients traités à l'Ustekinumab, montrent une réponse positive dans 53% des cas, contre 35% de réponse dans le groupe placebo [70]. L'utilisation de ces anticorps entraîne une diminution de la production d'IL-12, d'IL-23, de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IFN}\gamma$ par les cellules de la *lamina propria*.

L'IL-6 est une cytokine impliquée dans l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T. En interaction avec l'IL-12 et l'IL-23, elle entraîne une réponse inflammatoire de type Th1 et Th17 [68, 71]. Un traitement au Tocilizumab, un anticorps humanisé dirigé contre le récepteur à l'IL-6, a montré une efficacité au bout de 12 semaines chez des patients atteints de la MC [72].

Des anticorps dirigés directement contre l'IL-17 sont également en cours d'évaluation dans le traitement de la MC. L'efficacité de l'un de ces anticorps, l'AIN457, a déjà été testé chez des patients atteints de psoriasis et d'arthrite rhumatoïde [73].

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont la production est réduite dans la MC [74]. L'administration d'IL-10 recombinante chez les patients atteints de MC s'est illustrée par des résultats contradictoires. En effet, alors qu'une réduction de l'expression de $\text{TNF}\alpha$ est observée, l'expression de l' $\text{IFN}\gamma$ est augmentée chez les patients traités par l'IL-10. De plus, aucun effet clinique bénéfique n'a été observé à ce jour [75, 76].

Enfin, l'utilisation de cellules souches est également une piste thérapeutique envisagée dans le traitement des MICI. En effet, ces cellules sont essentielles pour le maintien de l'intégrité de l'ensemble des tissus. Le contrôle de la différenciation des cellules souches adultes représente donc un fort potentiel thérapeutique dans la régénération de tissus et dans le traitement de nombreuses maladies dégénératives. Les cellules souches embryonnaires possèdent un potentiel pluripotent et peuvent se différencier aussi bien en cellules épithéliales intestinales qu'en cellules immunitaires. Cette capacité peut entraîner la restauration de l'épithélium intestinal et le rééquilibrage de la balance immunitaire chez des souris développant une colite. La première étude montrant une régression de la MC après transplantation de cellules souches hématopoïétiques date de 1993 [77]. La phase I d'un essai clinique basé sur une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques montre une nette régression de la pathologie [78]. Un autre essai clinique, basé sur une transplantation autologue de cellules souches issues de tissu adipeux sous-cutané montre une réparation complète des fistules chez six patients sur huit [79]. De plus, il a été montré que, lors d'une transplantation allogénique de cellules souches, ces cellules vont spécifiquement peupler les zones atteintes du côlon dans un modèle de colite induite par le TNBS chez le rat [80, 81]. L'ensemble de ces travaux montre l'intérêt de ce traitement potentiel dans l'induction d'une rémission à long terme des MICI.

CHAPITRE II :

L'INFLAMMATION : NOTIONS GENERALES

L'inflammation est définie comme l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. Deux type d'immunités sont décrites : l'immunité innée (ou naturelle), qui ne dépend pas d'une exposition préalable aux pathogènes, et l'immunité acquise (adaptative), qui est mise en jeu lors d'une exposition à un pathogène donné. Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées : agent infectieux, substance étrangère inerte, agent physique, lésion cyto-tissulaire post-traumatique... L'inflammation commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir certaines cellules de l'organisme (monocytes, macrophages, lymphocytes) ou des protéines circulantes (anticorps, protéines du complément, facteur de Hageman...). A la phase de reconnaissance fait suite la mise en jeu séquentielle d'un ensemble de cellules et de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable.

Les types cellulaires immunitaires impliqués dans l'inflammation sont : les lymphocytes, les cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques), les mastocytes et les polynucléaires.

Différents types de cellules immunitaires sont susceptibles de participer à la réaction inflammatoire à travers la production et la libération d'un très large spectre de médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Ces cellules sont des cellules sanguines circulantes ou des cellules résidentes, après un passage obligatoire par la circulation sanguine. Toutes ces cellules sont issues de la moelle osseuse et d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche pluripotente. Sous l'influence de différents facteurs (facteurs de croissance, cytokines...) cette cellule s'engage dans la différenciation d'une lignée cellulaire et devient une cellule progénitrice, ou cellule souche engagée (Figure 4). Après plusieurs divisions, les cellules progénitrices deviennent spécifiques d'une seule lignée, ou cellules précurseurs, qui se divisent et se différencient (Figure 4).

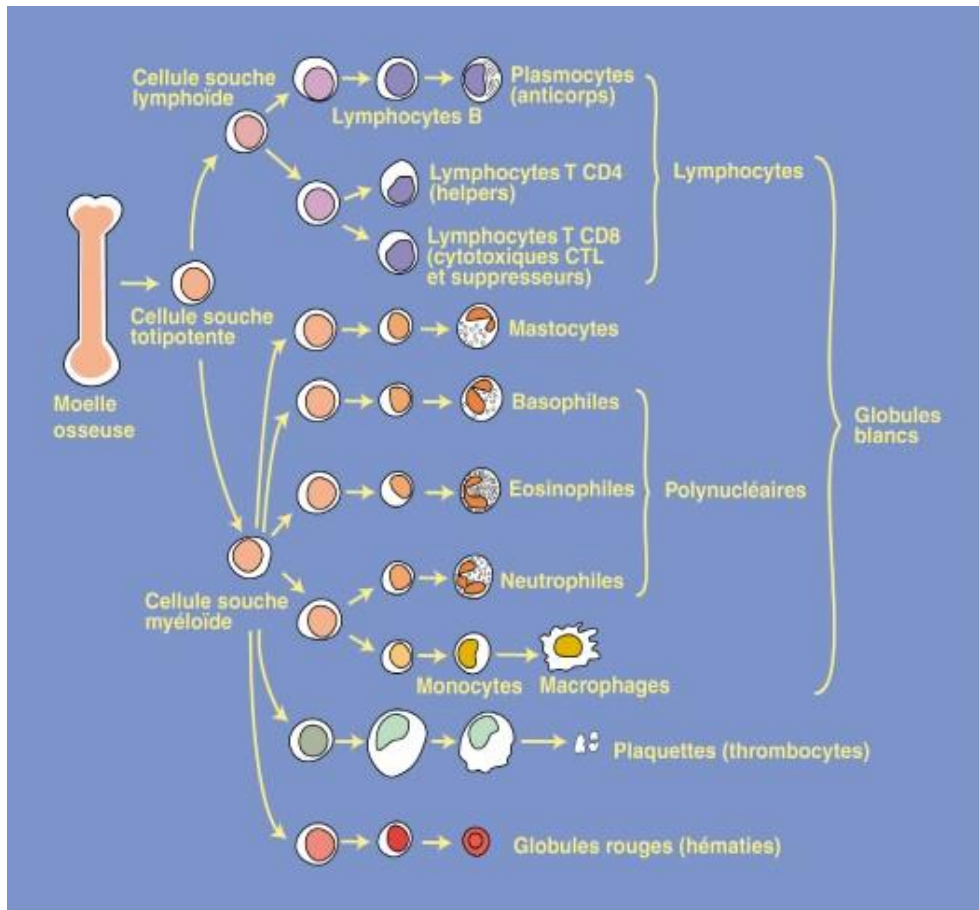


Figure 4. Illustration de la différenciation des cellules du système immunitaire

I. L'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme et la plus rapide, qui est mise en jeu en quelques heures. Elle repose sur la dégradation non spécifique des pathogènes. En effet, les cellules de l'immunité innée n'ont pas de récepteur spécifique de l'antigène, mais sont efficacement dirigées contre des motifs de pathogènes conservés au cours de l'évolution: les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) [82]. Les PAMPs regroupent des composants de la paroi cellulaire bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, les acides lipotéichoïques des parois bactériennes, mais aussi les nucléotides bactériens tels que les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien et l'ARN double brin de certains virus. De manière générale, l'hôte distingue les signaux émis par les micro-organismes grâce à des récepteurs transmembranaires, les PRRs (Pattern Recognising Receptor). Les PRRs les plus connus sont les TLR (toll-like receptor) et les NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), présents essentiellement à la surface des cellules épithéliales intestinales et des cellules immunitaires [83]. Bien que non spécifique, la

réponse innée présente l'avantage d'avoir à sa disposition et de façon immédiate un grand nombre de cellules portant les PRRs et donc prêtes à combattre un pathogène. D'une part, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles sont les phagocytes les plus efficaces. D'autre part, les voies du complément ainsi que la lyse cellulaire par les cellules cytotoxiques vont intervenir également dans cette réponse. Tous ces composants vont agir en vue de la dégradation des pathogènes ou d'éléments du non-soi, mais également en stimulant les voies de la réponse immune spécifique.

1.1. Les TLRs

Les TLRs forment une famille de récepteurs membranaires [82, 84] exprimés à la surface des cellules épithéliales, des cellules dendritiques, des macrophages et des monocytes [83]. Ils détectent les bactéries extracellulaires et initient les réponses de l'immunité innée [85]. Actuellement dix récepteurs de type Toll ont été clonés chez l'homme [86]. Chaque TLR est capable de reconnaître un ou plusieurs motifs moléculaires bactériens, viraux ou fongiques [87] (Figure 5). Les TLRs induisent l'expression de gènes très variés, incluant des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines, des facteurs antimicrobiens, des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), permettant d'armer les cellules de l'hôte contre les pathogènes. Les voies de signalisation des TLRs sont complexes et entraînent différentes réponses biologiques. Après activation des TLRs, une cascade de signaux intracellulaires conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B et entraîne la transcription de gènes modulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Figure 5).

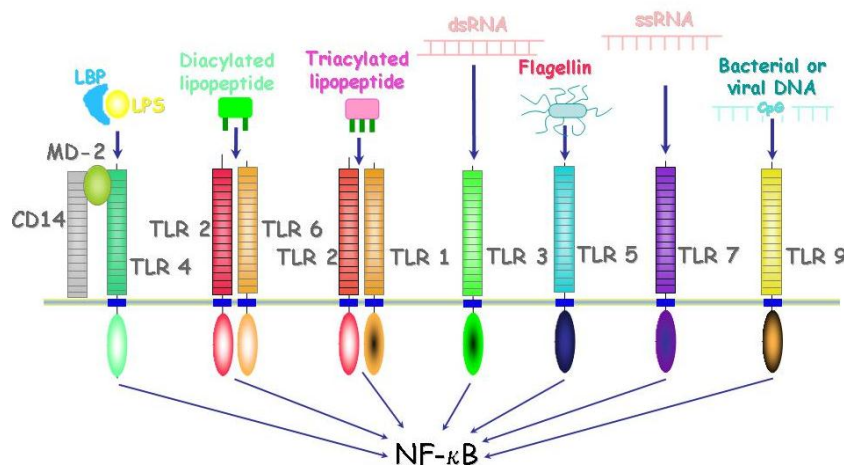


Figure 5. Les TLR et leurs ligands ; activation de la voie NF κ B

1.2. Les défensines

L'immunité non spécifique fait intervenir de nombreux peptides dotés d'une activité antimicrobienne. Parmi ces peptides, on dénombre différentes familles dont les défensines. Elles constituent une famille de peptides cationiques antimicrobiens possédant un large spectre (bactéries Gram+ et Gram-, champignons, virus enveloppés). Les défensines sont produites en abondance par les tissus impliqués dans la défense antimicrobienne, tels que la peau et la muqueuse intestinale. Chez l'homme, au sein de cette famille, sont reconnues les alpha- et les bêta-défensines [88]. Il existe six sous-types d' α - défensines, les HNP (human neutrophil peptide) 1 à 4 et les HD (human defensin) 5 et 6. Dix-sept sous-types de β - défensines: (HBD)*n* (human beta defensin, *n* étant le numéro d'incrémentation), ont été identifiés.

Les α -défensines HNP 1, 2 et 3 sont principalement synthétisées sous forme de prépropeptide par les promyélocytes, puis stockées dans les granules azurophiles des neutrophiles, mais peuvent aussi être induites dans les monocytes et les lymphocytes CD8+. Les α -défensines HD 5 et 6 sont, par contre, constitutivement produites par les cellules de Paneth du tube digestif.

La β -défensine 1 est la seule HBD exprimée de manière constitutive, les autres étant induites en réponse à l'inflammation [89]. Les β -défensines sont sécrétées par de nombreux epithelia ; par exemple l'expression de HBD-2, HBD-3 et HBD- 4 est induite dans les kératinocytes, les cellules épithéliales bronchiques et intestinales en réponse à l'IL-1 et/ou au lipopolysaccharide (LPS). Le LPS étant reconnu par le TLR-4, ce dernier est impliqué dans la régulation de l'expression de HBD-2 [90].

Outre leur activité cytotoxique contre les bactéries, les défensines possèdent également une activité proinflammatoire. En effet, les β -défensines HBD-1 et 2 vont promouvoir le chimiotactisme des cellules exprimant les récepteur CCR-6, comme les cellules dendritiques immatures, les lymphocytes T et les polynucléaires neutrophiles [91, 92]. Ce processus les rapproche fonctionnellement des chémokines, et en particulier de CCL-20, ligand du récepteur CCR-6. Parallèlement, HNP-1, 2 et 3 induisent le recrutement de monocytes, de lymphocytes T naïfs et de cellules dendritiques immatures *via* un récepteur encore inconnu.

1.3. Les cellules dendritiques

Identifiées par le marqueur CD11c, les cellules dendritiques constituent une population très hétérogène. Leur capacité principale, conservée dans tous les types de cellules dendritiques, est leur fonction de présentation d'antigène à des cellules T naïves alors que les macrophages et les lymphocytes B ne peuvent activer que des cellules T pré-activées. Les fonctions des cellules dendritiques sont hétérogènes et dépendent de leur maturation, des interactions avec les autres cellules et de l'environnement cytokinique dans lequel elles se trouvent. Elles jouent un rôle dans la polarisation des lymphocytes en lymphocytes de type Th1 ou de type Th2. Selon leur maturité, elles peuvent activer ou supprimer les réponses des LT auxiliaires ou encore induire l'anergie des LT [93, 94]. Les cellules dendritiques immatures ont de faibles capacités à présenter l'antigène, mais après maturation (activation par les ligands des TLR ou par les cytokines), elles migrent dans les organes lymphoïdes [95] et vont pouvoir agir pleinement en tant que cellules présentatrices d'antigène. Leur fonction peut être régulée par les cellules NK qui peuvent soit tuer les cellules dendritiques immatures soit au contraire entraîner leur activation et leur maturation *via* la synthèse de l'IFN γ et de TNF α [96]. Les cellules dendritiques sont très présentes dans certains tissus notamment l'intestin, où elles jouent un rôle aussi bien dans la tolérance à la microflore commensale que dans la génération d'une immunité contre les pathogènes [97].

Au niveau de la muqueuse intestinale, les cellules dendritiques (CD) sont les cellules clés du contrôle de l'immunité contre les pathogènes et de la tolérance envers les organismes commensaux. Les CD expriment toute la gamme des récepteurs PRR (pattern recognition receptor) TLR et NOD, leur permettant de distinguer les pathogènes des organismes commensaux, et d'activer ou de maintenir quiescentes les cellules T effectrices [98]. Si les cellules dendritiques sont les acteurs cellulaires du contrôle d'identité pathogène à la frontière intestinale, les récepteurs PRR tels que les TLRs et NOD sont les acteurs moléculaires garants de la reconnaissance des constituants bactériens.

1.4. Les polynucléaires

Les polynucléaires ou granulocytes sont divisés en trois classes selon l'apparence histologique de leurs granules après coloration : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Le recrutement de neutrophiles au niveau du site inflammatoire représente la première ligne de défense de l'organisme en cas d'infection. Les neutrophiles sont de

puissants phagocytes, ils représentent 50 à 75% des leucocytes du sang. Sous l'influence de facteurs chimiotactiques, les neutrophiles migrent jusqu'au foyer infectieux où, grâce à leurs récepteurs membranaires spécifiques, ils vont se fixer et phagocyter les particules étrangères opsonisées.

Le pouvoir lytique des neutrophiles vis-à-vis des microorganismes pathogènes est lié à la présence dans leurs granules sécrétoires de nombreuses enzymes dont certaines participent à la dégradation de la particule phagocytée, alors que d'autres génèrent des radicaux libres oxygénés toxiques pour de nombreux pathogènes comme l'enzyme myéloperoxidase (MPO). Après dégranulation des neutrophiles, la MPO induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui ont la capacité de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques. Le dosage de l'activité myéloperoxidase est d'ailleurs couramment utilisé comme un marqueur de l'infiltration neutrophilaire dans les tissus.

1.5. Les macrophages

Dans la moelle osseuse, les pro-monocytes se multiplient tout en continuant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante (en 24 à 48 h), les monocytes quittent la moelle osseuse en traversant les sinusoides vasculaires entre les cellules endothéliales et se retrouvent dans le sang. Les monocytes restent environ 24 heures dans le sang circulant ($1/2$ vie = 8 heures) puis quittent ce dernier pour les tissus où ils achèvent leur maturation en devenant un macrophage (Figure 6). On peut distinguer les macrophages recrutés des macrophages résidents.

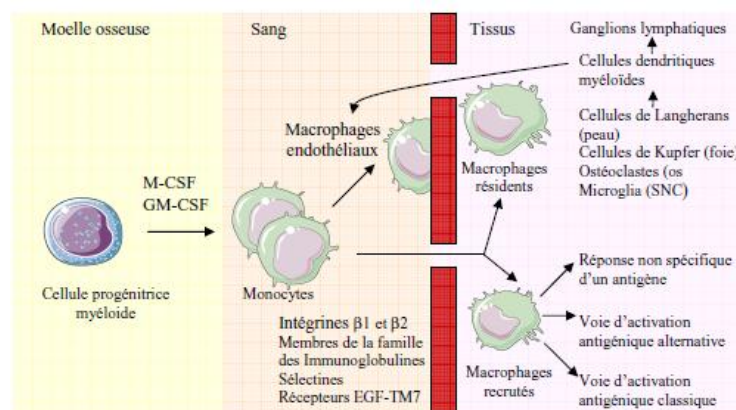


Figure 6. La différenciation en macrophage

d'après Gordon *et al.*[93]. Des molécules d'adhésion contrôlent la migration des cellules sanguines à travers l'endothélium. Ces molécules incluent des intégrines ($\beta 1$ et $\beta 2$ entre autres), des molécules de la famille des immunoglobulines (comme CD31), des sélectines et des récepteurs de type facteur de croissance épidermique à 7 domaines transmembranaires (comme EGF-TM7).

Les macrophages résidents se retrouvent au niveau du foie (cellules de Kupffer), de la peau (cellules de Langerhans) et au niveau des tissus conjonctifs associés au tractus digestif. Le phénotype de ces cellules reste mal défini mais semble être très dépendant du tissu et du microenvironnement dans lesquels elles résident. Les macrophages résidents cessent de proliférer mais leur synthèse d'ARNm et de protéines est très active [93]. Les macrophages recrutés au cours d'une inflammation ont une durée de vie très courte. Ils peuvent être activés en réponse à un antigène ou à un corps étranger [93].

Les monocytes/macrophages exercent leurs actions grâce à leurs propriétés de mobilité, d'adhérence, de phagocytose, de digestion et de sécrétion.

Leur rôle est essentiel dans les processus d'épuration de l'organisme. Avec leurs propriétés de sécrétion et de phagocytose, ils interviennent avec efficacité dans l'immunité innée et acquise. Après avoir digéré un pathogène, un macrophage peut présenter un antigène de manière à stimuler un lymphocyte T spécifique. La stimulation lymphocytaire par un macrophage est moindre par rapport à celle induite par une cellule dendritique, mais les macrophages sont capables de présenter des antigènes associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et donc de stimuler des lymphocytes CD4+.

La capacité des macrophages à montrer une variété de phénotype en réponse à différents stimuli a été utilisée pour les classer en différentes catégories en fonction de leur activité. Sur le même concept de l'activation Th1 ou Th2 des cellules T, le concept de polarisation M1/M2 pour les macrophages a donc été mis en place. Les macrophages M1 peuvent être décrits comme les macrophages pro-inflammatoires et les M2 comme les macrophages anti-inflammatoires (Figure 7). Plus récemment une troisième population de macrophage a été décrite, les « wound macrophages » (Figure 7).

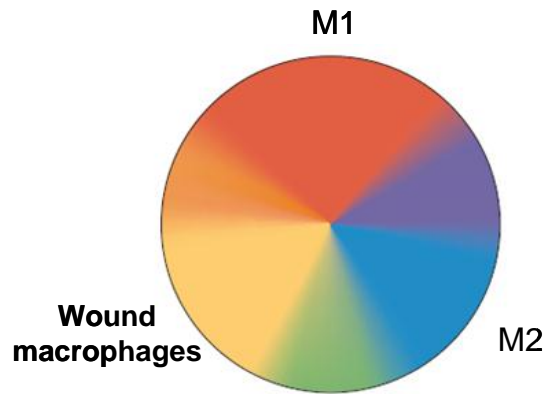


Figure 7. Représentation en roue des trois populations de macrophages existantes [99]. Chaque couleur primaire représente une population macrophagique. Le rouge, la population M1, le bleu, la population M2 et le jaune la population « Wound macrophage ». Les couleurs secondaires représentent le partage phénotypique et la transition des macrophages.

La polarisation des **macrophages M1**, pro-inflammatoires, est induite par l'IFN γ et le LPS. Ces macrophages M1 expriment le récepteur à la fraction constante des anticorps, le CD16, et vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'interleukine 23 (IL-23), l'IL-12, et l'IL-6. Leur rôle est d'éliminer les agents pathogènes et les cellules tumorales. De plus, ces macrophages M1 sont capables d'induire la polarisation des cellules T en cellules de type Th1 [100] (Figure 8).

La polarisation des **macrophages M2**, est induite par l'IL-4 et l'IL-13 [100] et serait plutôt anti-inflammatoire ou réparatrice. Ces macrophages M2 expriment le récepteur au mannose CD206 et produisent de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires mais de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Ces macrophages M2 induisent une réponse immunitaire de type Th2 (Figure 8). Ils jouent également un rôle dans la défense parasitaire et dans la production d'IL-10, de TGF β et de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1RA) qui ont pour action de diminuer le processus inflammatoire induit par les macrophages de type M1. De plus les M2 ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules T par contact cellule-cellule [100]. Les macrophages M2 expriment également des protéines impliquées dans la réparation tissulaire comme les métalloprotéases 1 et 12.

La troisième population de macrophages est impliquée dans la réparation tissulaire et partage un phénotype mixte M1 et M2 [101]. Cette population est appelée « **wound macrophage** » pour son implication dans la réparation tissulaire. Elle peut être activée aussi bien par une réaction immunitaire innée qu'acquise. L'IL-4 produite sur le site de la blessure par les granulocytes et les mastocytes va induire la conversion des monocytes résidents en

wound macrophages (Figure 8). Les lymphocytes Th2, à travers la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, peuvent également participer à cette polarisation (Figure 8). Ces macrophages vont contrôler la réparation tissulaire grâce à leur capacité à induire l'apoptose des cellules et en participant à l'élimination des débris cellulaires présents sur le site de la blessure. De plus l'IL-4 va stimuler l'activité arginase des macrophages conduisant à la production d'ornithine, un précurseur des polyamines et du collagène, contribuant à la production de matrice extracellulaire, nécessaire à la réparation tissulaire.

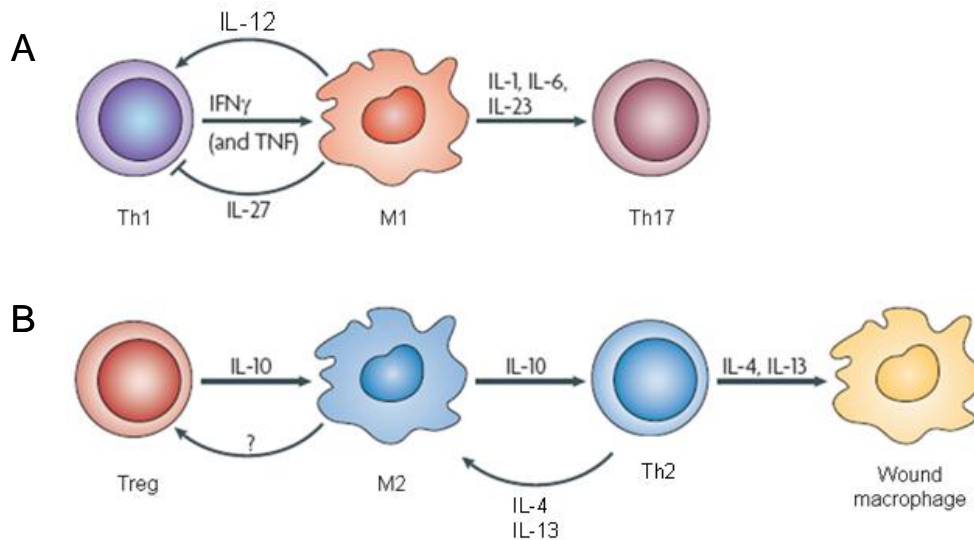


Figure 8. Interaction entre les macrophages et les cellules T.

D'après [99, 100]

A) L'IFN γ sécrété par les cellules Th1 active le phénotype M1 des macrophages qui à leur tour par la sécrétion d'IL-12 vont activer les cellules Th1, ou les inhiber par la sécrétion d'IL-17. Les macrophages M1 peuvent également induire l'activation des cellules Th17.

B) L'IL-10 sécrétée par les lymphocytes Treg active la population de macrophage M2, qui vont également synthétiser l'IL-10 permettant l'activation des cellules T de type Th2. Les cellules Th2 à leur tour vont pouvoir induire le développement de « wound macrophage » via la sécrétion d'IL4 et d'IL-13.

II. L'immunité acquise

C'est la seconde ligne de défense de l'organisme, elle se met en place plus lentement (4 à 8 jours) et repose sur la détection spécifique d'antigènes étrangers conduisant à des mécanismes d'élimination des microorganismes portant ces antigènes tout en restant tolérant aux antigènes du soi. La réponse adaptative présente deux volets : la réponse humorale, basée sur la production d'immunoglobulines par les plasmocytes issus de la différenciation des lymphocytes B et la réponse cellulaire basée sur l'action des lymphocytes T qui coordonnent les différents axes de la réponse immunitaire et détruisent les cellules infectées. La mise en

jeu de ces différentes cellules nécessite une organisation spatiale et temporelle particulière qui implique des organes spécialisés dans la maturation des lymphocytes (les organes lymphoïdes primaires), et des organes spécialisés dans la rencontre entre les lymphocytes et leurs antigènes (les organes lymphoïdes secondaires : rate, ganglions lymphatiques, amygdales, plaque de Peyer), des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes (les CPAs) et enfin une recirculation efficace des lymphocytes dans l'ensemble des tissus. Les lymphocytes au repos qu'ils soient T ou B présentent tous la même apparence cytologique; le seul moyen de les différencier est de se baser sur l'expression de leurs protéines membranaires.

II.1. Les lymphocytes B

Ce sont les lymphocytes producteurs d'anticorps. L'activation et la prolifération des lymphocytes B ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où des CPAs présentent l'antigène aux lymphocytes naïfs circulants. Les cellules ainsi activées arrêtent alors leur migration, entrent en division et vont former des clones qui vont se différencier en cellules effectrices, les plasmocytes. Ces plasmocytes vont migrer par chimiotactisme vers les sites d'infection grâce aux cytokines libérées au niveau des sites inflammatoires. La différenciation des LB est dépendante des LT. En effet, leur différenciation nécessite un signal délivré par l'antigène résultant de l'interaction d'une cellule présentatrice d'Ag et d'un LT $CD4^+$. Cette interaction entraîne l'activation du LB ainsi que la différenciation finale du LB en plasmocyte sécrétant des anticorps (Figure 9) [102]. Tous les LB stimulés par un Ag ne se transforment pas en plasmocyte, certains deviennent des LB mémoire.

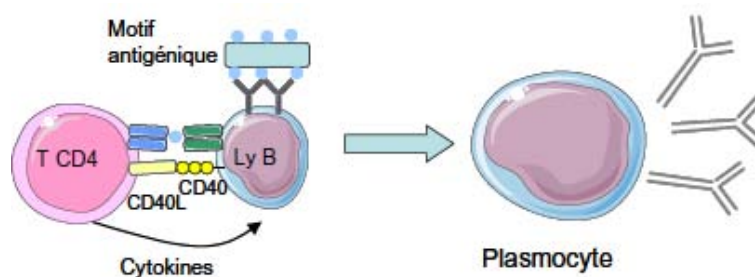


Figure 9. La réponse B thymo-dépendante.

L'antigène qui se fixe au récepteur de la cellule B (LyB) la stimule tout en étant ingéré et apprêté en peptides. Les signaux provenant de l'antigène et de la cellule T $CD4^+$ vont déclencher la prolifération et la différenciation de la cellule B en plasmocyte sécrétant d'anticorps spécifiques.

II.2. Les lymphocytes T

Parmi les lymphocytes T, on distingue deux sous-populations importantes ; les lymphocytes auxiliaires (T helper) et les lymphocytes cytotoxiques.

Les lymphocytes T auxiliaires exprimant le CD4 sont les cellules coordinatrices majeures du système immunitaire. Les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le CD8 participent uniquement à la réponse cellulaire. Ces deux populations diffèrent de façon fondamentale dans leurs modalités de reconnaissance de l'antigène et dans les fonctions régulatrices ou effectrices qu'elles exercent. L'activation du lymphocyte T est un terme qui regroupe les événements de la signalisation menant à la survie de la cellule, sa prolifération, le réarrangement de son cytosquelette, l'augmentation de son métabolisme et la variation de son profil d'expression génique. Le lymphocyte T naïf activé peut se différencier en lymphocyte effecteur, Th1 ou Th2 [103, 104], capable de sécréter des cytokines et de réguler la réponse immunitaire. La différenciation en Th1 ou Th2 est multifactorielle et dépend entre autres du contexte cytokinique et des molécules de co-stimulation exprimées par la CPA. [94, 105]. Une vision simple de la dichotomie Th1/Th2 indique que les lymphocytes Th1, auxiliaires des lymphocytes T CD8+, sont impliqués dans la réponse cytotoxique et les lymphocytes Th2, auxiliaires des lymphocytes B, initient des réponses humorales [106]. Il a été montré plus récemment qu'il existait une autre voie de différenciation pour les lymphocytes T auxiliaires naïfs, la voie Th17 [107]. Ces différentes sous-populations sont sous le contrôle d'un autre type de cellules T CD4+, les lymphocytes T régulateurs (Treg).

Lymphocytes Th1: Ce sont les lymphocytes pro-inflammatoires principaux et sont induits dans un contexte présentant de l'IL-12 et de l'IFN γ [108, 109], et produisent des cytokines inflammatoires comme l'IL-2, l'IFN γ ou le TNF α [110]. Ces lymphocytes induisent le déclenchement des réponses immunitaires cellulaires mettant en jeu les lymphocytes T cytotoxiques. Ils se développent préférentiellement durant les infections par les bactéries intracellulaires et les maladies chroniques inflammatoires et sont impliqués dans l'auto-immunité organe-spécifique [111]. De plus, ils participent au recrutement des macrophages au niveau des sites d'infection et stimulent leur capacité microbicide [103].

Lymphocytes Th2: Ils sont induits en présence d'IL-4 et produisent essentiellement les interleukines 4, 5, 6, 10 et 13. Les cellules Th2 participent à l'immunité humorale en activant les lymphocytes B pour qu'ils se développent en cellules productrices d'anticorps. Ils vont

également activer les polynucléaires éosinophiles (granulocytes cytotoxiques de l'immunité innée) en vue d'une réponse indépendante des phagocytes [112]. Ces lymphocytes prédominent dans les réponses aux allergènes [111].

Lymphocytes Th17: Découverts en 2005 par l'équipe de Langrich dans un modèle murin d'EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale), cette nouvelle classe de lymphocytes auxiliaires se caractérise par la production d'IL-17 [113]. L'IL-17 promeut l'inflammation en induisant la production de nombreuses cytokines et chimiokines (IL-21, IL-6, IL-22, TNF...), en favorisant le recrutement des neutrophiles, en augmentant la production d'anticorps et en activant les cellules T [114]. Ces cellules Th17 se développent en présence de TGFβ (Tumor growth factor) et d'IL-6 [115, 116]. Leur expansion nécessitant la présence d'IL-23, ces cellules expriment le récepteur à cette interleukine [117]. Ces cellules Th17 sont pro-inflammatoires et pourraient jouer un rôle dans les maladies auto-immunes telles que l'arthrite induite par le collagène et l'encéphalite auto-immune expérimentale [118]. De plus, ces lymphocytes induisent la production de défensines par les cellules épithéliales [119]. Une présence constitutive de ces lymphocytes a été démontrée dans la muqueuse intestinale aussi bien chez l'homme que chez la souris [120]. Chez l'homme, contrairement à la souris, il a été décrit l'existence de lymphocytes Th17 produisant de l'IFNγ, dénommés Th17/Th1 [117]. Le rôle de cette population partageant des caractéristiques communes aux cellules Th1 et aux cellules Th17 est encore inconnu.

Lymphocytes T régulateurs (Treg): Ils expriment la molécule de surface CD25 (récepteur de l'IL-2) et CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4) [121]. Comme ces marqueurs ne leur sont pas spécifiques, le seul marqueur fiable des Treg est le facteur de transcription Foxp3 dont l'inactivation conduit à une absence totale du développement de ce sous-type cellulaire [122, 123]. Ils représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4+ chez l'homme et la souris. Impliqués dans la tolérance, ils peuvent être induits par des CPAs dites tolérogènes [124, 125], on parle alors de Treg induits. Cependant, il existe également une population de Treg dits naturels qui se développent directement à partir des précurseurs thymiques. Tous ces lymphocytes ne sécrètent pas de cytokines pro-inflammatoires mais de l'IL-10 et du TGFβ [126]. Ils possèdent la capacité d'inhiber l'activation des cellules T soit par des mécanismes directs de contact cellule/cellule, soit indirectement en modulant négativement l'activation de la CPA [127].

Les principales caractéristiques de ces différents types de cellules auxiliaires sont résumées ci-dessous (Figure 10).

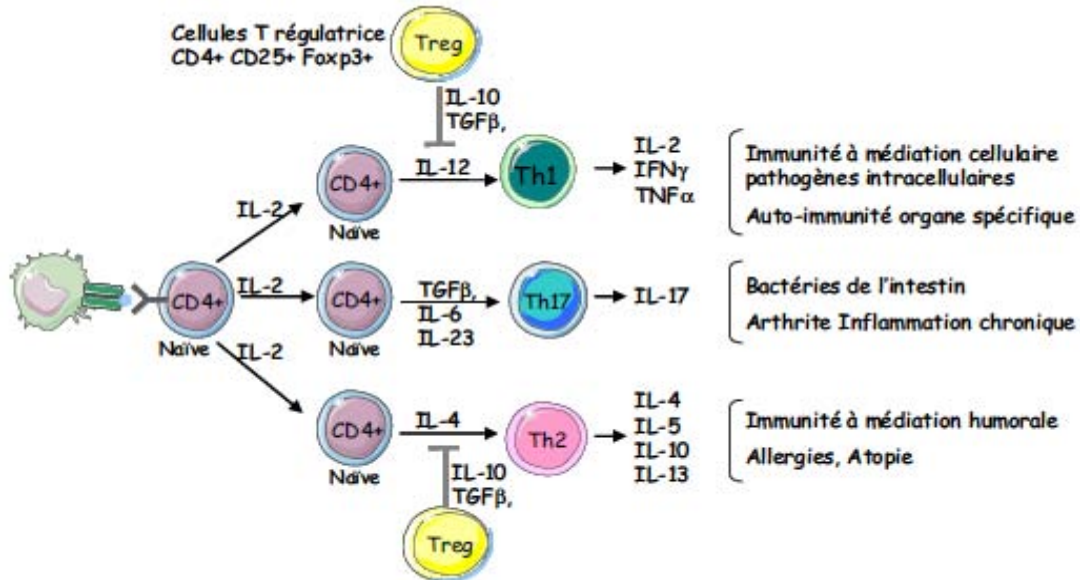


Figure 10. La différenciation des lymphocytes auxiliaires.
D'après [128]

Les balances immunitaires : Th1/Th2 et Th17/Treg

L'orientation des réponses immunitaires est sous le contrôle d'un équilibre entre les réponses Th1 et Th2 [109], mais également d'un équilibre entre les réponses Th17 et Treg.

En effet, les lymphocytes Th1, via l'IFN γ , vont diminuer l'expansion des lymphocytes Th2 et/ou la production de cytokines favorisant la réponse humorale (IL-4, 5, 6, 10 et 13) et les lymphocytes Th2, via la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 et vont inhiber la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'expansion des lymphocytes Th1 (Figure 11). Un déséquilibre vers l'une de ces deux voies est donc susceptible d'affecter le développement de la réponse immunitaire protectrice [106].

La balance entre les lymphocytes Th17 et Treg est cruciale pour le maintien de l'homéostasie immunitaire. Le TGF β est requis pour la différenciation de ces deux populations lymphocytaires. Cependant, seul le TGF β entraîne une différenciation des lymphocytes en Treg [129]. A l'inverse, en présence d'IL-6, le TGF β va induire une différenciation des lymphocytes de type Th17 et une inhibition de la différenciation des lymphocytes en Treg [115, 130] (Figure 11). Le contrôle du taux d'IL-6 apparaît donc primordial pour maintenir la balance Th17/Treg.

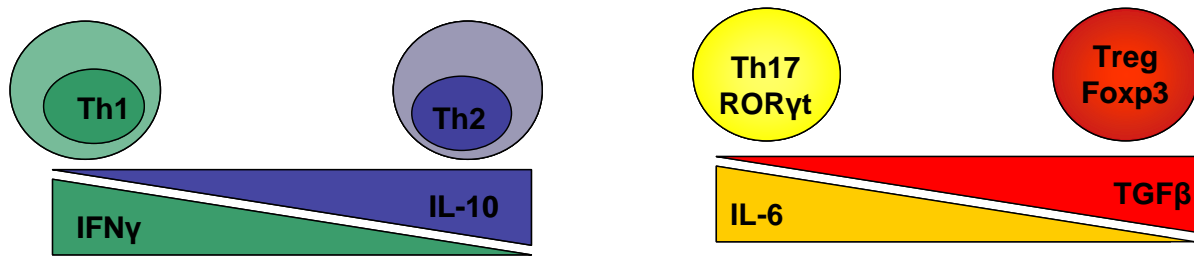


Figure 11. Les Balances immunitaires Th1/Th2 et Th17/Treg

De nombreuses cytokines sont impliquées dans la régulation de ces deux grandes balances. Un maintien rigoureux de ces balances est nécessaire pour le bon fonctionnement du système immunitaire. Cela implique la régulation de nombreuses cytokines comme l'IFN γ et l'IL-10, ou l'IL-6 et le TGF β .

CHAPITRE III :

LA BARRIÈRE INTESTINALE DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

La muqueuse intestinale représente une des plus grandes surfaces d'échange de l'organisme, exposée et en interaction avec le milieu extérieur. L'intestin grêle à lui seul représente 300 à 400 m² d'échange. Cette large surface du tractus gastro-intestinal joue tout d'abord un rôle de filtre, avec une perméabilité sélective qui permet le passage des nutriments depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation générale mais également un rôle de barrière, qui prévient la pénétration dans l'organisme des microorganismes, des virus, des antigènes et des toxines, contenus en grande quantité dans la lumière intestinale [131].

La barrière intestinale est une barrière de défense organisée en quatre unités fonctionnelles incluant i/ la barrière mécanique, ii/ la barrière écologique, correspondant à la flore intestinale, iii/ la barrière physique (ou barrière épithéliale), composée des cellules de l'épithélium et de leurs sécrétions iv/ la barrière immunologique, comprenant les cellules immunitaires et leurs sécrétions (immunoglobulines, cytokines,...) (Figure 12). Ces unités fonctionnelles entretiennent entre elles des relations permanentes, très étroites et finement régulées, assurant le maintien de l'homéostasie générale de l'organisme [131].

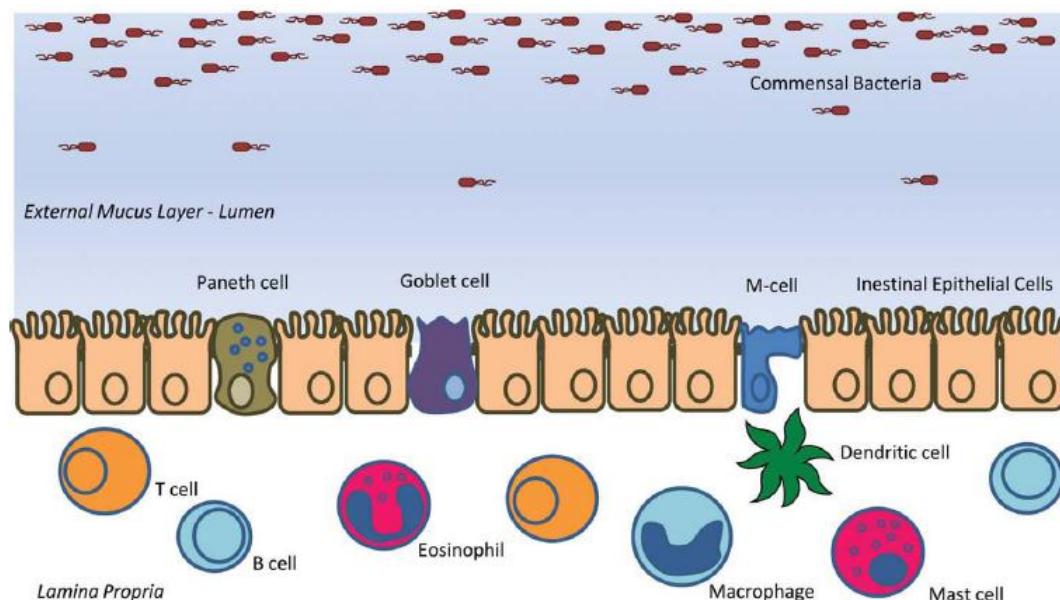


Figure 12. Éléments composants la barrière intestinale.
[131]

I. La barrière mécanique

Les mouvements péristaltiques intestinaux constituent une barrière très efficace pour diminuer la pénétration des bactéries intestinales dans l'organisme. Ces mouvements de propulsion préviennent la prolifération des bactéries dans l'intestin de même que leur translocation à travers la muqueuse intestinale [132, 133].

II. La barrière écologique

Le nombre de souches différentes au sein de la microflore intestinale est estimé entre 300 et 500 [134], dont 30 à 40 représentent 90% de la totalité. Certaines des bactéries de la flore intestinale sont des pathogènes ou des pathogènes opportunistes. La densité du contenu bactérien dans le tube digestif est fortement variable en fonction du niveau anatomique. En effet la flore intestinale est répartie selon un gradient de 10^4 Unités Formant des Colonies (UFC) par gramme de contenu intestinal au niveau du jéjunum contre 10^7 au niveau de l'iléon terminal. Dans les parties hautes du tube digestif, cette flore est majoritairement représentée par des bactéries aérobies et quelques anaérobies, en particulier les entérocoques. Les sucs gastriques, la bile et les sécrétions pancréatiques, ainsi que la vitesse de transit s'opposent à leur colonisation stable dans ces régions du tractus gastro-intestinal. A l'inverse, le côlon héberge une flore essentiellement anaérobie, avec une densité très élevée de 10^{12} UFC par gramme de contenu intestinal. Les bactéries anaérobies de type *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* sont largement prédominantes. Le temps de transit plus lent au niveau du côlon offre une niche écologique favorable à ces bactéries et leur permet d'y établir des populations stables. Les bactéries commensales sont indispensables au bon fonctionnement du système digestif [135]. Elles modulent l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des nutriments, renforcent la barrière muqueuse et participent au métabolisme des xénobiotiques, à l'angiogenèse et à la maturation intestinale post-natale.

En plus d'être un constituant de la barrière intestinale, la flore bactérienne (Figure 12) participe activement à l'établissement et au maintien de cette fonction de barrière en interagissant en symbiose avec d'autres entités comme la barrière physique et immunitaire. Des études menées sur des animaux axéniques ont montré que la flore commensale était indispensable au bon développement et à la différenciation des cellules épithéliales

intestinales [136, 137]. De plus, le dialogue entre les bactéries et l'hôte à l'interface de la muqueuse intestinale est indispensable à la mise en place d'un système immunitaire compétent. Une autre fonction exercée par la flore intestinale est donc la maturation et la stimulation du système immunitaire de l'hôte, en stimulant les lymphocytes intraépithéliaux [138], l'activité phagocytaire [139] ainsi que la sécrétion des cytokines par les macrophages [140]. L'importance de la flore commensale dans le bon développement du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT : Gut-associated lymphoid tissues) a également été démontrée [141, 142]. Le contact permanent de l'épithélium intestinal et de la flore intestinale microbienne provoque une stimulation continue du système immunitaire au sein de la muqueuse digestive et donne lieu au concept « d'inflammation physiologique » de la muqueuse intestinale.

La dysbiose dans les MICI :

L'altération des populations bactériennes dans la lumière intestinale a été décrite comme pouvant être impliquée dans le processus pathologique [135]. Des rôles inducteurs et/ou amplificateurs de l'inflammation intestinale ont été prêtés à la flore commensale intestinale. D'un point de vue quantitatif, aussi bien au niveau de la lumière, du mucus que de la muqueuse intestinale, la population totale bactérienne est plus importante en masse chez les patients atteints d'une MICI [143-145], suggérant un défaut dans les mécanismes qui normalement séquestrent les bactéries. Malgré cet accroissement quantitatif, la biodiversité du microbiote est réduite chez les patients atteints de MICI [146]. Ainsi, d'un point de vue qualitatif, la composition du microbiote diffère chez ces patients avec une diminution des espèces bactériennes potentiellement bénéfiques (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*) et une augmentation des bactéries pathogènes associées à la muqueuse intestinale (*Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*) [147, 148].

A titre d'exemple, des études récentes ont montré chez les patients atteints de MC une diminution de la quantité de *Faecalibacterium prausnitzii* (*F.prausnitzii*), un micro-organisme normalement prédominant au niveau intestinal [149]. De manière intéressante, l'administration orale de ce micro-organisme réduit de manière importante la sévérité de la colite induite chez l'animal [150]. Une augmentation de la production d'IL-10 et une diminution de l'expression de l'IFN γ et la capacité de *F.prausnitzii* à corriger la dysbiose induite par la colite mène à la diminution de la sévérité de cette dernière. Un taux peu élevé de *F.prausnitzii* est associé à un risque de rechute post-opératoire d'une MC iléale [150]. Ces

différentes données montrent un lien direct entre la diminution de certaines espèces microbiennes au niveau du microbiote et le développement d'une MC.

III. La barrière physique ou barrière épithéliale

III.1. Les cellules différenciées

L'épithélium intestinal est un épithélium polarisé constitué d'une monocouche de cellules épithéliales (entérocytes) présentant une bordure en brosse à l'extrémité apicale (Figure 13). Un pool de cellules souches pluripotentes présent au niveau des cryptes de l'intestin donne lieu à l'ensemble des cellules présentes dans la monocouche. Ces cellules comprennent les entérocytes, les cellules caliciformes (sécrétrices de mucus), les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Les membranes de chaque cellule épithéliale constituent l'essentiel de cette barrière : elles sont imperméables aux solutés hydrophiles, sauf si des transporteurs spécifiques existent.

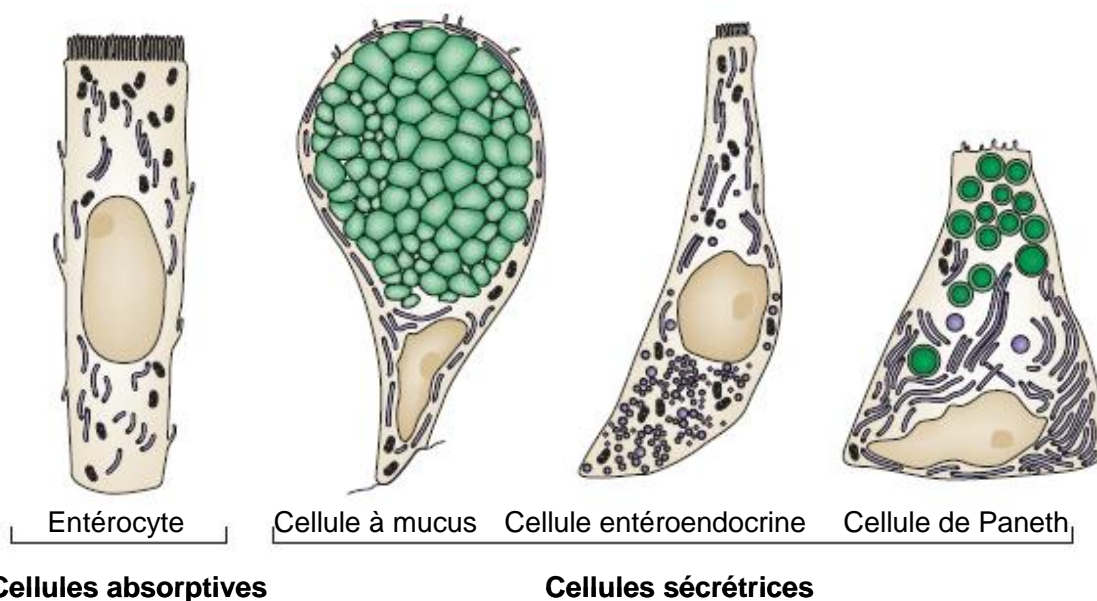


Figure 13. Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle.

[151] Les cellules souches intestinales donnent naissance à quatre types cellulaires différenciés. Les cellules absorbatives, ou entérocytes, représentent la très grande majorité de la population épithéliale intestinale. Les trois autres types sont des cellules sécrétrices : les cellules à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (qui migrent au fond de la crypte et sont absentes dans le côlon).

Les entérocytes sont les seules cellules du lignage absorptif. Ils représentent environ 80% de la population totale de l'épithélium intestinal. Ce sont des cellules hautement polarisées et hautement spécialisées, qui assurent l'absorption, le métabolisme et le transfert des nutriments, depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation sanguine. Le pôle apical des entérocytes qui présente une bordure en brosse spécialisée structurée par des filaments d'actine, est responsable des échanges avec la lumière intestinale. Le pôle latéral est en contact avec les cellules adjacentes et assure la fonction de barrière, ceci grâce aux jonctions intercellulaires qui assurent l'étanchéité de l'épithélium.

Les cellules entéroendocrines, issues du lignage sécréteur, sont plus petites et beaucoup moins nombreuses. En réponse aux nutriments, elles sécrètent dans la circulation générale des hormones et des peptides tels que la substance P, l'entéroglucagon, la somatostatine et le polypeptide intestinal vasoactif.

Les cellules caliciformes, ou mucosécrétrices (environ 5%), sont considérées comme des glandes exocrines unicellulaires. Ces cellules assurent la synthèse des différents composants du mucus, comme les mucines. Au sein de l'épithélium colique, la proportion des cellules caliciformes est fortement augmentée (environ 15%).

Les cellules de Paneth assurent la défense non spécifique contre les micro-organismes dans l'intestin. Elles se distinguent par leurs granules apicaux éosinophiles. Elles sont fonctionnellement identiques aux neutrophiles. Lors de l'exposition à des bactéries ou à des antigènes microbiens, les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens comme les défensines dans la lumière. Ces cellules ne sont pas retrouvées en condition physiologique au niveau du côlon, qui ne présente donc que trois types cellulaires.

En plus de ces quatre types cellulaires différenciés que nous venons de décrire, on trouve également au sein de l'épithélium intestinal, au niveau des plaques de Peyer, un autre type cellulaire spécialisé, **les cellules M**. Ces cellules sont de type épithélial, mais leur origine est encore mal élucidée. Les cellules M diffèrent des entérocytes, par l'absence de bordure en brosse et par la présence d'invagination de la membrane plasmique basale

III.2. Les peptides antimicrobiens et plus particulièrement les défensines

Les cellules épithéliales intestinales sécrètent de nombreux peptides antimicrobiens qui limitent la croissance des bactéries de la flore intestinale et des bactéries pathogènes. Les

peptides microbiens en plus de leur activité lytique sur les bactéries, stimulent la sécrétion de chlore et d'eau par les cellules épithéliales [152]. Ce mécanisme de « flush » (lavage), diminue l'adhérence des bactéries à l'épithélium et participe à leur élimination.

Les défensines comme nous l'avons décrit précédemment sont une classe de peptides antimicrobiens. Chez l'homme, les défensines sont présentes d'une extrémité à l'autre du tractus digestif. Au niveau de la muqueuse buccale par exemple, HBD-1 est présente de manière constitutive tout comme HBD-2, dont la présence est normalement conditionnée par l'existence d'une inflammation. Cependant l'expression de HBD-2 au niveau de la muqueuse buccale est augmentée lors d'une exposition à des germes commensaux [153]. Au niveau de l'intestin, les défensines sont stockées dans les granules sécrétoires des cellules de Paneth.

Les défensines dans les MICI :

Des études géniques ont révélé qu'une mutation dans les gènes codant pour les α -défensines HD-5 et HD-6 dans l'iléon et pour la β défensine HBD-5 dans le côlon, serait responsable d'une prédisposition au développement d'une MC [154, 155].

Depuis quelques années, une attention particulière est portée aux cellules de Paneth dans la MC. En effet, plusieurs travaux ont montré une diminution de l'expression des défensines [156, 157] et de NOD2 dans les cellules de Paneth de patients atteints de MC [158, 159]. De plus, un lien fonctionnel a été établi entre NOD2 et les défensines. En effet, l'activation de NOD2 par son ligand augmente la transcription des gènes codant pour les défensines [160]. Une conséquence des mutations de NOD2, présentes chez un certain nombre de patients atteints de MC, pourrait être une diminution de l'expression des défensines.

Cependant, l'ensemble de ces résultats est remis en question par de récents travaux montrant que la diminution de l'expression de l'ARNm codant pour les défensines, et plus particulièrement les α défensines, est corrélée à la diminution d'autres gènes épithéliaux spécifiques [161]. Cette diminution d'expression serait donc due à une diminution du nombre de cellules épithéliales au cours de l'inflammation. De plus, les cellules de Paneth présentes au niveau de l'inflammation lors d'une MC iléale, montrent un taux d'expression d' α -défensines identique à celui des cellules de Paneth présentes dans une zone éloignée de l'inflammation. De plus, bien que la production de défensine soit stimulée par NOD2, l'expression de défensines dans cette étude n'est pas dépendante du statut NOD2 du patient [161].

Le récepteur NOD2 semble essentiellement impliqué dans la régulation de l'expression de la défensine HBD-2. L'expression de HBD-2 est plus importante dans les zones inflammatoires

que dans les zones non inflammatoires aussi bien dans la MC que dans la RCH [162]. Cependant, l'expression de HBD2 est retrouvée dans 18% des biopsies coliques de patients contrôles, dans 34% des biopsies de patients atteints d'une MC et dans 53% de celles de patients atteints de RCH [163]. Cette différence peut s'expliquer par la mutation du gène NOD2 retrouvé dans certains cas de MC mais pas dans la RCH [162].

III.3. Le mucus

L'intégralité de l'épithélium intestinal est recouverte d'une fine couche de mucus (Figure 12) constituant une barrière physique entre le tissu sous-jacent, les micro-organismes, les toxines et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Le rôle majeur du mucus est donc de limiter l'accès du contenu luminal au milieu intérieur. Pour cela, l'érosion de la couche de mucus du côté de la lumière due à l'action d'enzymes et au frottement des matières en cours de la digestion est compensée par des sécrétions en provenance de la muqueuse. Le mucus est issu de la polymérisation de monomères de mucines. Les mucines sont une famille de grandes protéines fortement glycosylées. Chez l'homme, il existe 19 gènes codant pour les mucines, appelés MUC. Au niveau du côlon la présence de mucines est essentiellement due à l'expression du gène MUC2 au sein de cellules caliciformes. La mucine est responsable des propriétés visco-élastiques et gélifiantes du mucus [164]. Il existe deux formes de mucus (Figure 14): un gel insoluble dans l'eau adhérent à la muqueuse (inner mucus layer) [165] et une couche visqueuse hydrosoluble qui recouvre le gel (outer mucus layer) [166]. Alors que la majorité des micro-organismes de la flore intestinale est retrouvée au niveau de la couche de mucus supérieure, le mucus adjacent à la muqueuse peut être considéré comme relativement stérile. La stérilité de cette couche de mucus peut être expliquée par la présence d'une forte concentration de molécules antimicrobiennes telles que les défensines, produites par les cellules de Paneth.

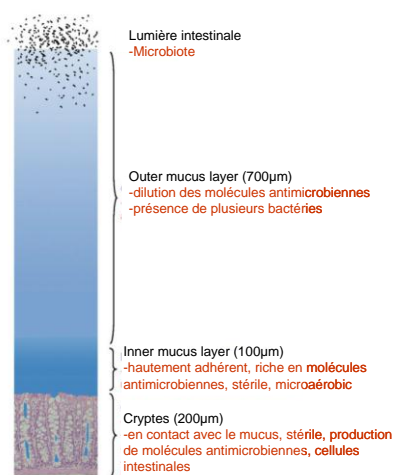


Figure 14. Représentation de la barrière de mucus dans le côlon de souris.

D'après [167].

L'importance de la barrière de mucus a été illustrée chez les souris déficientes pour MUC2, où des bactéries ont été retrouvées en contact direct avec les cellules épithéliales intestinales [166]. Ces souris développent une inflammation intestinale [168] ainsi que des cancers coliques [169]. Cependant chez l'homme, aucune mutation de MUC2 n'a été associée à un défaut de barrière [170]. Le mucus ne constitue pas seulement une barrière physique face aux organismes présents dans la lumière intestinale, c'est aussi un inhibiteur compétitif de leur adhésion aux cellules épithéliales.

Le mucus dans les MICI :

Le dogme conventionnel au sein de la MC décrit une hypertrophie des cellules caliciformes et une augmentation de la formation de mucus [171, 172], suggérant qu'une déficience de sécrétion de mucus ne peut pas être à l'origine du défaut de fonction de barrière observée au cours de cette pathologie. A la différence de la MC, la RCH est couramment caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des cellules caliciformes donc par une diminution de la production de MUC2 [173, 174], et par conséquent une diminution de la barrière de mucus. Chez les patients atteints de MICI, le défaut de mucus entraîne une perte de sa capacité de rétention des bactéries luminales. La couche de mucus adjacente aux cellules épithéliales n'est plus stérile et les cellules se retrouvent en contact direct avec de nombreuses bactéries [175]. Cette incapacité du mucus à séquestrer les bactéries a été observée chez les patients atteints d'une MC et présentant une mutation du gène NOD2 [7]. Il peut être supposé que le d'expression de NOD2 chez certains patients atteints de la MC, entraîne une diminution de l'expression de HBD-2, participant à la diminution de l'activité anti-microbienne du mucus observée chez ces patients.

III.4. Les jonctions intercellulaires

L'espace entre les cellules adjacentes est fermé par des jonctions intercellulaires (Figure 15).

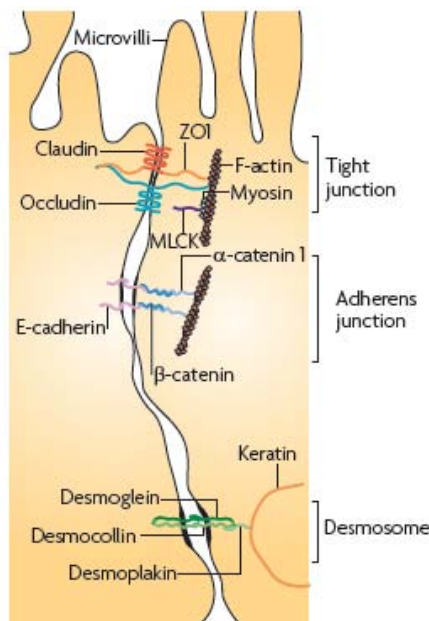


Figure 15. Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires intestinales.
[170]

III.4.1. Les jonctions serrées :

Parmi ces jonctions, les jonctions serrées paraissent être les plus déterminantes, car leur perméabilité définit les fonctions de barrière d'un épithélium intestinal intact. La couche continue de cellules épithéliales, connectées entre elles par des jonctions serrées, module la perméabilité paracellulaire et la perméabilité transcellulaire (au travers des cellules), représentant la principale composante de la barrière intestinale [176].

Les jonctions serrées forment une ceinture sur le pourtour de la cellule épithéliale (Figure 15) et permettent ainsi d'assurer une perméabilité sélective. Sur le plan moléculaire, les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires, qui constituent le noyau de l'échafaudage moléculaire : occludine, claudines et JAM (*Junction Adhesion Molecule*). Des protéines cytoplasmiques sont associées à ces protéines transmembranaires (*Zonula Occludens* ou ZO) et constituent un lien entre les jonctions serrées, le cytosquelette d'actine et les jonctions adhérentes (Figure 15).

La famille des claudines compte 24 membres. Les variations de perméabilité et de sélectivité aux ions par leur charge et leur taille ont été attribuées à l'expression différentielle et au ratio de ces différentes claudines dans la jonction serrée [177, 178].

L'occludine est une protéine unique. Elle se situe à proximité des jonctions constituées par les claudines (Figure 16).

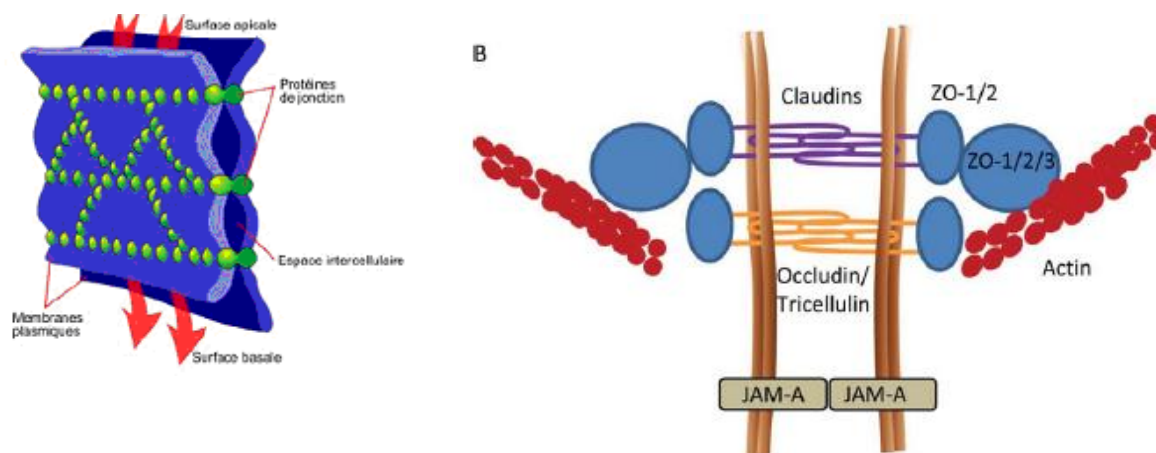


Figure 16. Représentation schématique des jonctions serrées et des protéines les constituant au niveau intestinal.

[131]

Elle interagit avec les cellules voisines via ses domaines extra-cellulaires pour établir le contact cellule-cellule. La localisation de l'occludine au niveau des jonctions serrées est régulée par sa phosphorylation. Sous sa forme non-phosphorylée, l'occludine est localisée à la membrane basolatérale cellulaire et dans les vésicules cytoplasmiques, alors que l'occludine phosphorylée est relocalisée au niveau des jonctions serrées [179]. Toutefois, l'importance physiologique de l'occludine est encore discutée. En effet, des travaux menés sur des souris déficientes pour l'occludine ont montré que ces animaux présentaient une barrière épithéliale normale [180]. On peut cependant imaginer que dans ce contexte d'absence de l'occludine, des réarrangements de la jonction serrée surviennent pour permettre l'homéostasie. De manière opposée, une étude récente a montré que l'occludine représentait une cible importante dans les altérations de la barrière induites par les cytokines [181].

Les protéines de la famille JAM font partie de la superfamille des immunoglobulines (IgSF). On retrouve dans cette famille JAM 1, 2, 3, 4 et JAM-L. JAM 4 est exprimée au niveau des jonctions des cellules épithéliales gastro-intestinales ; JAM 2 est retrouvée sur les cellules endothéliales. JAM 3 est exprimée par les lymphocytes T où elle agit en neutralisant les récepteurs à JAM 1 sur les cellules épithéliales, permettant la transmigration des lymphocytes à travers les jonctions [182]. JAM 1 est exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux et endothéliaux, comme le placenta, les poumons, le foie, le pancréas, le cœur, le

cerveau et l'intestin. On la retrouve également dans les plaquettes, les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes et les érythrocytes. Dans les cellules épithéliales, on la retrouve au niveau des jonctions serrées. JAM 1 influence de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la perméabilité paracellulaire, la polarité cellulaire, l'adhésion et la migration des cellules, l'angiogenèse et la migration leucocytaire.

Les protéines de la famille ZO, jouent un rôle d'adaptateurs moléculaires permettant la liaison de diverses protéines membranaires dont les protéines des jonctions serrées au cytosquelette d'actine, à des protéines régulatrices ou aux protéines des jonctions adhérentes [183] (Figure 16). En effet, les protéines transmembranaires claudines et occludine interagissent directement avec les protéines ZO comprenant ZO-1, ZO-2, ZO-3, et autres.

Cet arrangement protéique, en « fermeture éclair », maintient les cellules jointives et limite la diffusion paracellulaire aléatoire de molécules entre le compartiment apical et basolatéral.

III.4.2. Les jonctions adhérentes et les desmosomes :

Ils forment les autres composants des complexes paracellulaires. Les jonctions adhérentes sont composées des cadhérines et se situent immédiatement au dessous des jonctions serrées (Figure 15). Les desmosomes sont des molécules retrouvées ponctuellement et qui connectent les filaments intermédiaires du cytosquelette, entraînant de fortes liaisons entre les cellules et permettant donc le maintien de la proximité cellulaire (Figure 15). Les desmosomes sont également des sites majeurs de communication intercellulaire.

Les jonctions paracellulaires dans les MICI :

L'état des jonctions serrées est couramment associé à la régulation de la perméabilité de l'épithélium intestinal. Le défaut de barrière inclut donc une augmentation de la perméabilité paracellulaire qui entraîne une augmentation du flux entre les jonctions, pouvant également provenir de l'altération des cellules épithéliales dans des situations d'apoptose, d'érosion et d'ulcération. Les patients atteints de MICI présentent une augmentation de la perméabilité paracellulaire, qui reflète une perturbation de la fonction de barrière [184, 185]. De plus, il a été montré que l'augmentation de perméabilité intestinale chez les patients en rémission était un préalable à la rechute de la maladie [186, 187]. Comme explicité plus haut, les complexes

jonctionnels sont primordiaux dans le maintien de la barrière. L'expression de la claudine-5, de la claudine-8 et de l'occludine sont diminuées chez les patients atteints de MC [188]. De même, chez les patients atteints de RCH une diminution de l'expression des claudines 4 et 7 est observée [189]. Chez les patients atteints de MC et de RCH, une augmentation de la formation de pores par la claudine-2 est observée, cette claudine étant connue pour augmenter le passage des ions et des petites molécules non chargées [189, 190]. L'augmentation de l'expression de cette claudine est associée à un écartement plus important des jonctions serrées et donc d'un accroissement de la perméabilité paracellulaire intestinale [188].

De plus chez les patients atteints de MICI, on observe une baisse de l'expression de la protéine JAM-A, protéine dont l'invalidation chez la souris entraîne une susceptibilité augmentée à la colite induite au sulfate de dextran (DSS) [191, 192].

Il reste cependant à déterminer si cette augmentation de perméabilité précède la pathologie ou est une conséquence de l'inflammation intestinale. Il est intéressant de noter que cette augmentation est également observée chez les membres sains de la famille des malades, et certains finiront par développer la pathologie. Ceci suggère qu'une lésion de la barrière peut participer à la progression de la pathologie [193, 194] et illustre la physiopathologie multifactorielle des MICI.

La dégradation de la barrière épithéliale entraîne l'initiation de mécanismes pathogéniques en facilitant l'invasion bactérienne dans la muqueuse et en rendant possible une interaction excessive entre la microflore et le système immunitaire muqueux.

IV. La barrière immunologique :

Il s'agit d'un mécanisme de défense spécifique, qui consiste en la production d'anticorps sécrétoires et l'activation du système immunitaire associé à la muqueuse [195]. Les organes lymphoïdes sont des tissus organisés où ont lieu la différenciation des cellules (moelle osseuse, thymus) et l'initiation de la réponse immune (ganglions, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Pour produire des réponses immunitaires efficaces contre des micro-organismes entériques potentiellement dangereux ou maintenir sa tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou des protéines alimentaires, le tractus intestinal possède un réseau lymphoïde complexe, responsable du transport des antigènes et de leur présentation aux cellules T dans le tissu intestinal. Il s'agit du tissu lymphoïde associé à la muqueuse

digestive ou GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) [196]. Le GALT peut être divisé en sites inducteurs et effecteurs diffus, incluant la *lamina propria* et les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), et des structures plus organisées comme les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les plaques des cryptes [195]. Le GALT est le plus grand organe de l'immunité, et contient à lui seul plus de 80% des cellules immunitaires de l'organisme. Il renferme la plus grande quantité de lymphocytes du corps humain, et est également composé de mastocytes (2-5%) et de macrophages représentant 10 à 15% des cellules du GALT. De par leur position stratégique, à proximité des cellules épithéliales, l'ensemble de ces cellules immunitaires forme une barrière efficace qui s'oppose au passage ou à la diffusion des bactéries et toxines de la lumière intestinale vers l'organisme.

Les crypto-plaques sont des structures peu organisées situées à la base de cryptes épithéliales. Elles sont distribuées de manière aléatoire tout au long de l'intestin, mais sont numériquement plus importante dans l'intestin grêle que dans le côlon. Les crypto-plaques sont des organes lymphoïdes secondaires indispensables à la génération des lymphocytes intra-épithéliaux [197].

Les plaques de Peyer sont des amas de follicules lymphoïdes situés immédiatement sous l'épithélium et uniquement au niveau de l'intestin grêle. Elles sont organisées en 3 zones fonctionnellement spécialisées (Figure 17):

- Le dôme, recouvert d'un épithélium spécialisé (EAF : épithélium associé au follicule) formé d'entérocytes et entre lesquels s'intercalent des cellules M. Ces cellules sont particulièrement adaptées à une interaction directe avec les micro-organismes et autres antigènes de la lumière intestinale. Les cellules M captent les particules de la lumière intestinale à leur pôle apical par endocytose ou phagocytose, puis les libèrent du côté basolatéral.
- La zone inter folliculaire, ou zone T-dépendante, qui est le site privilégié de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, mais également des macrophages.
- Le follicule lymphoïde qui est très riche en lymphocytes B et qui contient également quelques lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires.

Une étude effectuée sur des souris déficientes pour NOD2 a montré l'implication de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie des plaques de Peyer. En effet, ces animaux présentent une augmentation du nombre des plaques de Peyer associée à une augmentation de

la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-12). Cette réponse immunitaire exacerbée est accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale et d'une translocation bactérienne [198]. Une susceptibilité à développer une colite sévère est également observée chez ces animaux [198].

Les follicules lymphoïdes isolés sont anatomiquement comparables aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer. Ils sont présents aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon. Ils jouent le même rôle que les plaques de Peyer, à savoir l'induction de la réponse immunitaire par présentation des antigènes luminaux aux cellules présentatrices d'antigènes.

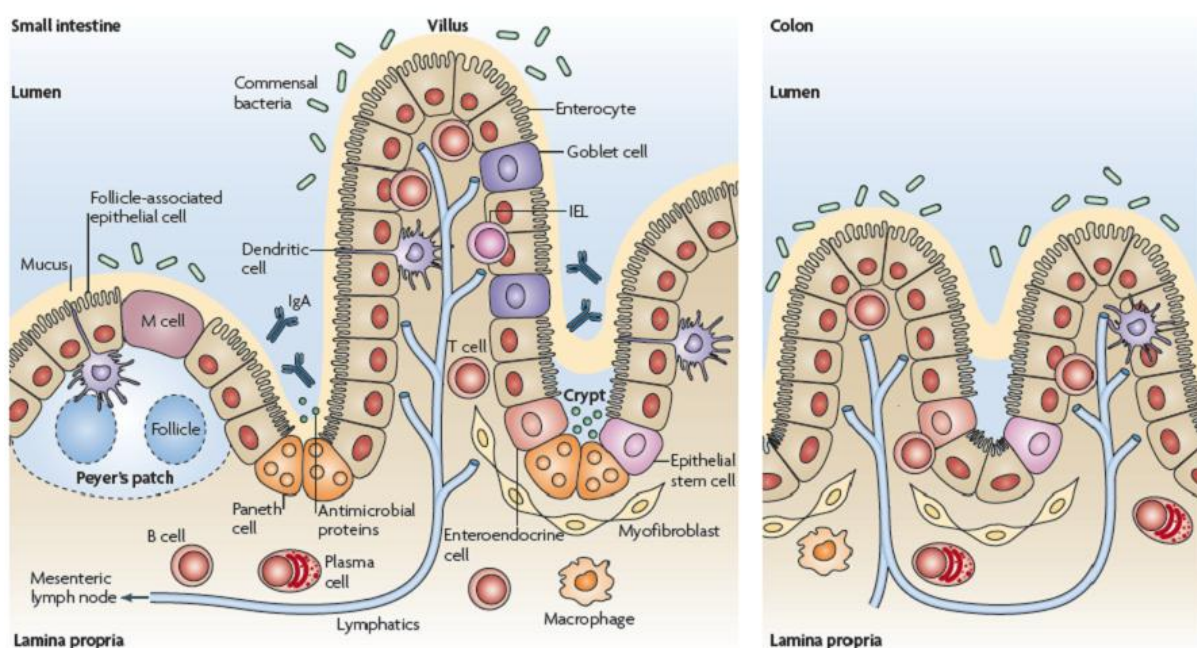


Figure 17. Le système immunitaire intestinal au niveau de l'intestin grêle et du côlon. [199]

La barrière immunologique dans les MICI :

Les MICI peuvent être définies comme résultant d'une inflammation destructive du tube digestif [41]. Elles sont également caractérisées par une réponse immunitaire inappropriée et exagérée pouvant atteindre l'ensemble de la paroi digestive comme dans la MC ou confinée aux couches superficielles comme dans la RCH. Dans la MC, il est suggéré que cette exacerbation de la réponse du système immunitaire vient d'une communication anormale entre les microbes intestinaux et le GALT [42, 200]. Le système de défense de l'hôte va réagir contre les bactéries non pathogènes de la flore intestinale ; il y a alors perte de la tolérance immunitaire. Dans les MICI, les altérations des mécanismes épithéliaux de l'immunité innée

auraient pour cause une modification des patrons d'expression des TLR. Par exemple, l'expression de TLR3 est sous-réglée dans la MC alors que TLR4 et son co-récepteur CD14 sont fortement surexprimés dans la MC et la RCH [201].

De plus, cette activation incongrue du système immunitaire va entraîner un déséquilibre des balances immunitaires nécessaire au maintien de l'homéostasie immunitaire (voir p31).

La balance Th1/Th2

Dans la MC les lymphocytes de type Th1 (Figure 18), caractérisés par une production élevée d'IL2 et d'IFN γ , sont prédominants [202]. En effet, un dysfonctionnement des réponses aux PRR conduirait les cellules dendritiques à reconnaître de façon inappropriée les bactéries commensales et à induire une réponse de type Th1 normalement dévolue aux organismes pathogènes [203].

A l'inverse, au cours de la RCH la muqueuse des patients est infiltrée majoritairement par des lymphocytes Th2 (Figure 18) atypiques caractérisés par la production d'IL5, d'IL13 et de TGF β [204].

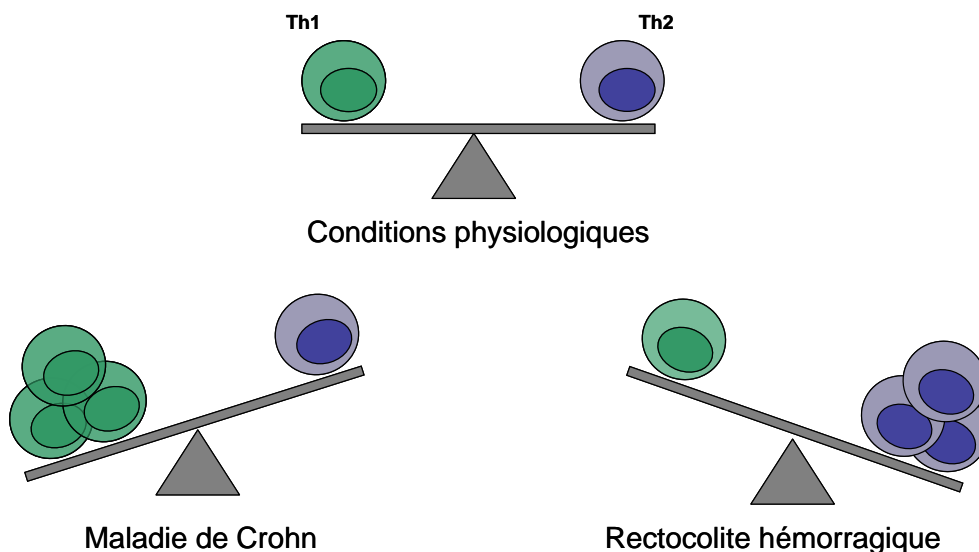


Figure 18. Schématisation du déséquilibre des populations lymphocytaires effectives Th1 et Th2 au cours des MICI.

La balance Th17/Treg

Chez les patients atteints de MC ou de RCH, une augmentation importante du nombre de lymphocytes Th17 survient au niveau de la muqueuse intestinale en comparaison à des patients contrôles [205], associée à un taux élevé de cytokines produites par les cellules Th17 comme l'IL-21, l'IL-22 [206, 207]. De plus, le niveau intestinal d'IL-23, nécessaire à la mise

en place de ce système Th17, est augmenté chez les patients atteints de MC [68]. Cette suractivation du système immunitaire vers une réponse de type Th17 révèle l'IL-17 et l'IL-23 comme des cibles thérapeutiques dans les MICI et plus particulièrement dans la MC [73]. Alors qu'il apparaît évident que la réponse immunitaire de type Th17 est largement stimulée dans la MC, la régulation des lymphocytes Treg reste elle en débat.

En effet, les premières études s'intéressant aux lymphocytes Treg ont mis en évidence une diminution de leur taux circulant chez les patients souffrant de MICI, suggérant que cette diminution soit associée à la progression de la maladie en dérégulant la balance Th17/Treg [208, 209]. Cependant, plusieurs études ont montré qu'au niveau de la *lamina propria*, des ganglions lymphatiques mésentériques et de la muqueuse de patients atteints de MICI, le nombre de cellules Treg était augmenté en comparaison à des patients contrôles [209-211]. Ces résultats sont en accord avec le taux élevé de lymphocytes Treg retrouvé dans d'autres conditions d'inflammation intestinale comme la diverticulose [210]. L'hypothèse prédominante est un recrutement des lymphocytes Treg sur le site de l'inflammation de manière à rétablir l'homéostasie immunitaire.

L'interaction entre l'épithélium et l'immunité est à double sens. En effet, par leurs différentes sécrétions, les lymphocytes T activés vont pouvoir agir et moduler la barrière intestinale, notamment à travers leur action sur les protéines de jonctions (Figure 19).

Le TNF α et l'IFN γ sont deux molécules pro-inflammatoires pouvant être sécrétées par les cellules présentatrices d'antigène et les cellules Th1. L'expression de ces molécules est augmentée chez les patients atteints de MICI et leur implication dans la régulation de la barrière intestinale est maintenant décrite depuis 20 ans [212].

L'effet du TNF α sur la barrière a également été évalué sur des monocouches de cellules épithéliales intestinales. Le traitement par le TNF α de ces cellules augmente l'expression et l'activation de la kinase de la chaîne légère de myosine (Myosin light-chain kinase : MLCK), directement corrélée avec une augmentation de la perméabilité à travers les jonctions serrées [213, 214]. En effet, une fois active, la MLCK va phosphoryler la MLC ce qui va entraîner une contraction du cytosquelette d'actine et l'ouverture des jonctions serrées. Une augmentation similaire de l'expression et de l'activation de la MLCK est observée chez les patients atteints de MICI [215]. Donc l'implication du TNF α sur la dérégulation de la barrière serait essentiellement due à son action sur le cytosquelette. Au contraire, l'IFN γ aurait un effet direct sur les protéines de jonction. En effet, l'exposition de cellules à l'IFN γ entraîne

une endocytose de l'occludine, de JAM-1 et de la claudine-1, par un mécanisme de macropinocytose nécessitant également la phosphorylation de la MLC [216, 217].

Le rôle clé du TNF α dans les MICI est notamment avéré par l'utilisation d'anticorps anti TNF α chez les patients atteints de MC entraînant une diminution de l'inflammation et améliorant la fonction de barrière altérée au cours de la pathologie [218].

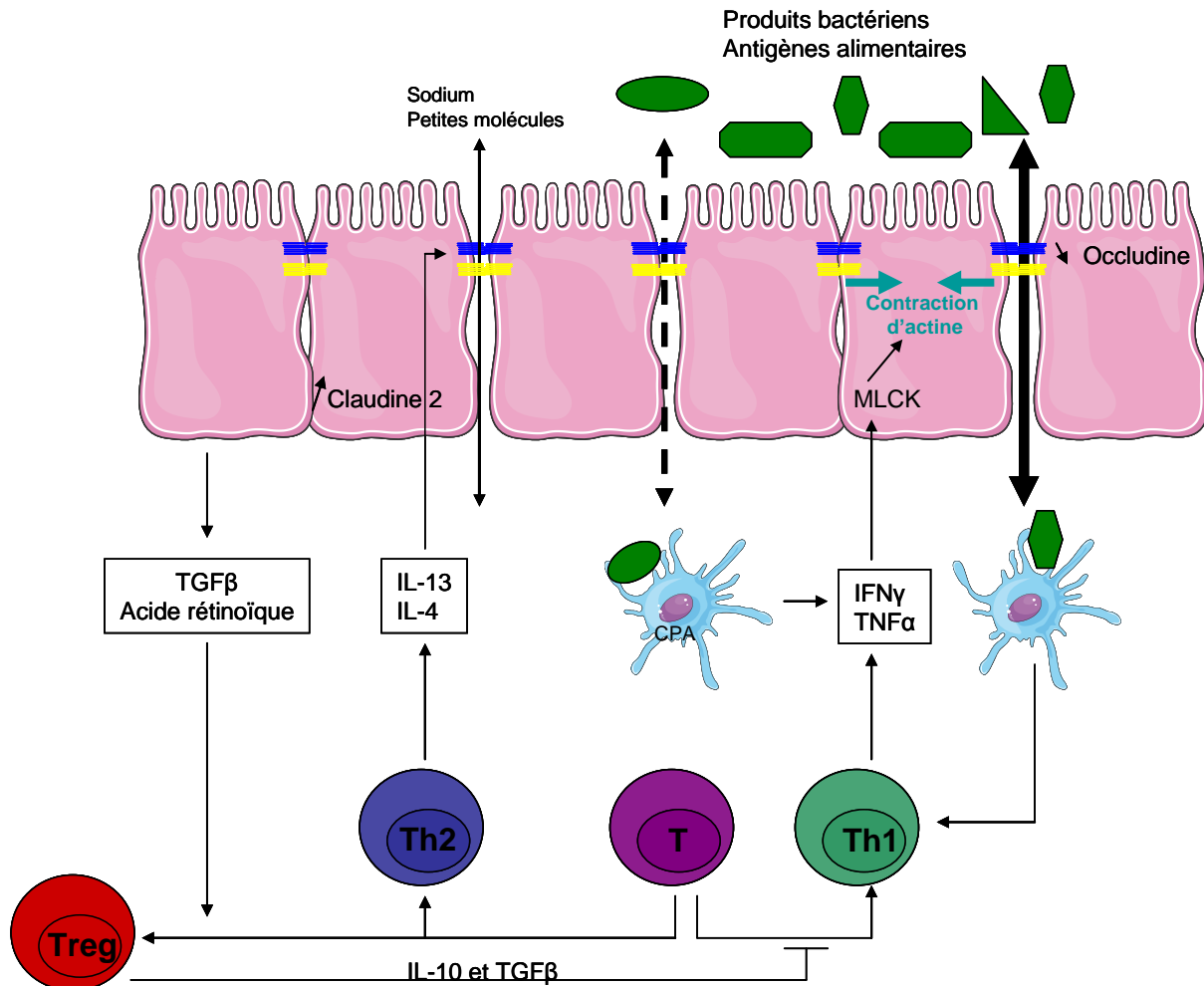


Figure 19. Interaction entre le système immunitaire et la régulation de la barrière intestinale.

d'après Turner, 2009 [170]. A la suite du passage des antigènes bactériens au travers de la barrière épithéliale intestinale, la reconnaissance de cet antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) entraînant la différenciation des cellules T en Th1 ou Th2, peut induire le développement d'une inflammation. Le TNF α et l'IFN γ sécrétés par les CPA et les cellules Th1, vont activer la MLCK entraînant une contraction du cytosquelette d'actine et induisant une augmentation du flux paracellulaire d'antigènes bactériens et ainsi amplifier le cycle de l'inflammation. L'IL-4 et l'IL-13, produites par les cellules Th2, provoquent une apoptose épithéliale et une augmentation de l'expression de la claudine-2, entraînant une augmentation des flux de cations. A l'inverse, si les CPA favorisent la différenciation des cellules T en cellules Treg, l'homéostasie de la muqueuse est maintenue et empêche le développement de l'inflammation. Cette différenciation peut être induite par l'acide rétinoïque et le TGF β dérivés des cellules épithéliales.

CHAPITRE IV :

LES MODELES DE COLITE EXPERIMENTALE CHEZ LE RONGEUR

Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une inflammation au niveau du côlon chez des espèces animales couramment utilisées en laboratoire. L'inflammation peut être provoquée par exposition de l'animal à divers agents physiques ou chimiques [219]. La colite peut aussi être induite chez des animaux transgéniques (KO) notamment par invalidation de gènes impliqués dans l'expression de certaines cytokines (IL-10) ou de certaines protéines des voies de signalisation de l'inflammation [219]. Cependant aucun modèle ne possède l'ensemble des caractéristiques cliniques et physiopathologiques des pathologies humaines, mais ces approches expérimentales permettent de mieux étudier la pathogénèse et les caractéristiques des MICI et de tester de nouveaux agents thérapeutiques potentiellement utilisables dans le traitement de ces pathologies.

I. Modèles d'inflammation spontanée

De nombreuses souches de souris n'ayant subi aucune induction chimique de colite ou de modification génétique, développent de manière spontanée une inflammation intestinale, mimant la complexité multifactorielle rencontrée dans les MICI.

I.1. Souris C3H/HeJ Bir

Les souris C3H/HeJ Bir sont déficientes en TLR-4 et ne répondent donc pas au LPS. Par ailleurs ces souris développent de manière spontanée une colite transmurale au niveau iléo-caecal et de la muqueuse au niveau du colon proximal. Cette colite spontanée apparaît à 3-4 semaines de vie et se résorbe à 10-12 semaines. L'augmentation d'IFN γ et d'IL-2 indique que ce modèle de colite est lié à une réponse de type Th1 [220]. La pathogénèse de cette colite implique une hyperréactivité des lymphocytes T et B contre les antigènes des bactéries luminales [221].

I.2. Souris SAMP/Yit

Cette souche murine développe de manière spontanée une inflammation intestinale transmurale localisée au niveau de l'iléon de manière similaire à la MC [222, 223]. La progression de la colite ainsi que l'augmentation de perméabilité intestinale sont de type Th1- et Th2-dépendantes. Dans ce modèle, une altération des cellules de Paneth ou des cellules caliciformes est également observée, et pourrait jouer un rôle dans l'initiation de l'inflammation. A 3 semaines de vie, une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale est observée chez ces souris.

II. Modèles génétiques

Le développement d'une grande variété de modèles murins transgéniques ou KO a ouvert de nouvelles voies d'études de la pathogénèse des MICI. Les études portent le plus couramment sur l'altération de la fonction de la barrière intestinale et/ou sur la régulation immunitaire. Les études sur les modèles génétiques de colite rapportent un excès dans l'activation ou un déficit dans l'inhibition de l'immunité, retrouvés dans les cellules immunitaires intestinales chez les patients atteints de MICI.

II.1. Souris KO IL-2 :

L'IL-2 est un régulateur indispensable du système immunitaire. Cette interleukine active les cellules T, les macrophages, les cellules NK ainsi que la différenciation des lymphocytes B. Les souris KO pour l'IL-2 développent une colite chronique [224] entre la 6^{ème} et la 15^{ème} semaine de vie. Dans ce modèle, l'intestin grêle est sain, alors que le côlon est sévèrement affecté ce qui se traduit par la présence d'ulcères et un épaississement de la paroi colique. En plus des abcès, une déplétion de mucus et une dysplasie des cellules épithéliales, symptômes également décrits dans les MICI chez l'homme, sont observés dans ce modèle [225]. Les souris de cette espèce montrent des concentrations muqueuses élevées en IL-12 et en IFN γ , suggérant que l'infiltrat des lymphocytes T est en partie composé de cellules de type Th1.

II.2. Souris KO IL-10 :

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire cruciale, produite par les cellules B, T et les macrophages. L'IL-10 a pour rôle de diminuer la fonction des cellules Th1, NK et des macrophages. Les souris KO pour l'IL-10 présentent une inflammation pouvant toucher l'ensemble de l'intestin [226]. Cependant les lésions sont le plus couramment observées au niveau du duodénum, du jéjunum et du côlon proximal. Il a été montré que l'inflammation développée dans ce modèle évolue en deux phases distinctes. Dans la phase précoce, l'IL-12 joue un rôle clé, impliquant une réponse de type Th1. Dans la phase tardive, l'absence d'IL-12 et la production d'IL-4 et d'IL-13, indiquent un mécanisme de type Th2. [227] La déplétion en cytokines induites par la réponse de type Th1 comme l'IFN γ et l'IL-12, empêche le développement d'une colite dans ce modèle [227, 228]. En condition exempte de pathogènes spécifiques (SPF), ces souris développent une inflammation moins sévère et limitée au côlon proximal, suggérant que dans ce modèle, la flore joue un rôle crucial dans le développement de la réponse immunitaire incontrôlée [226].

II.3. STAT-3 :

Signal transducer and activator of transcription (STAT-3) est une des molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'IL-10. L'inactivation du gène STAT-3 dans les macrophages et les neutrophiles entraîne chez les souris le développement d'une colite transmurale très proche de la MC aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon [229, 230]. Cependant aucune colite n'est observée chez les animaux déficients pour STAT-3 dans les lymphocytes T, suggérant que l'inflammation développée chez les souris KO pour IL-10 provient d'un dysfonctionnement des macrophages et non des cellules T.

III. Modèles de colite chimio-induite

Les modèles d'inflammation et de colite induites chez les rongeurs sains ou génétiquement susceptibles à la colite sont couramment utilisés pour faciliter l'induction des symptômes associés à la pathologie ainsi que pour obtenir une meilleure reproductibilité. Les modèles de colites chimio-induites, sont divisés en deux catégories : ceux induisant une perturbation de la barrière intestinale et ceux qui impliquent une réaction d'hypersensibilité induite par l'utilisation d'un haptène.

III.1. Perturbation de la barrière intestinale : Dextran Sulfate Sodium

L'apport de dextran sulfate sodium (DSS) dans l'eau de boisson des animaux (souris, rat, porc, hamster) induit une colite très reproductible pouvant être chronique ou aiguë suivant la dose et la durée de traitement. Un cycle de traitement par le DSS correspond généralement à 4-7 jours de DSS [231] suivis de quelques jours d'eau de boisson « normale ». Les altérations observées après traitement sont proches de celles observées au cours de la RCH : perte de poids, sang dans les fèces, diarrhées, ulcérations, érosion des cellules constituant la barrière intestinale et une importante infiltration de lymphocytes et de granulocytes [232, 233]. Il est généralement établi que le DSS est directement toxique au niveau basal des cryptes, ce qui va compromettre l'intégrité de la barrière intestinale et entraîner une intrusion des bactéries au niveau de la muqueuse. La toxicité du DSS est due aux groupements sulfate, car l'administration de dextran seul n'entraîne aucune symptomatologie chez les animaux. L'inflammation résultante de cette altération de la barrière s'avère être majoritairement de type innée. En effet, il a été montré qu'après traitement par le DSS, des souris déficientes en cellules T et B (souris SCID) développent une colite. L'immunité acquise n'est donc pas essentielle dans la réponse au DSS [234]. Le profil de cytokines chez des animaux ayant subi une inflammation aiguë ou chronique au DSS est différent. Alors qu'une inflammation aiguë au DSS est liée à une réponse inflammatoire de type Th1/Th17 (IL-6, IL-17, TNF α), une inflammation chronique implique une réponse de type Th2 (IL-4, IL-10) [235]. La réponse inflammatoire de type Th2 étant prédominante au sein de la RCH [236], une inflammation chronique au DSS semble alors plus représentative qu'une inflammation aiguë par cet agent. De plus, il a récemment été démontré que l'inflammation causée par le DSS proviendrait d'une accumulation de bactéries dans la couche de mucus adjacent à la muqueuse intestinale, mucus normalement « stérile ». Le contact direct de cellules de la muqueuses et des bactéries serait responsable de la réponse inflammatoire [237]

Le modèle DSS est couramment utilisé afin d'étudier la réponse du système immunitaire inné ainsi que les mécanismes de perturbation de la barrière intestinale lors de la colite [238]. Une répétition des cycles de traitements au DSS entraîne une dysplasie suivie d'un développement accru de tumeurs colorectales, évolution également observée de façon significative chez les patients atteints de MICI [239].

III.2. Colite induite par un haptène : Oxazolone/TNBS/DNBS

L'administration intra-rectale d'oxazolone est un des rares modèles de colite expérimentale induisant une inflammation de type Th2 [240, 241]. Ce type de colite montre une ressemblance histologique claire avec la RCH qui est dépendante aussi bien de la production d'IL-13 par les cellules NK que d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules T. Ce modèle permet le développement rapide d'une colite majoritairement confinée au niveau du côlon distal. Une infiltration de neutrophiles et de macrophages dans la muqueuse est observée et accompagnée d'une forte induction de TGFβ, ce qui va permettre de limiter l'extension, la sévérité et la durée de l'inflammation.

L'administration intra-rectale d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou de 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS) dissous dans l'éthanol à 50%, à des souris ou des rats sains, induit une colite expérimentale. L'éthanol est utilisé afin d'altérer l'intégrité de la paroi intestinale. Le TNBS/DNBS quant à lui, par son action d'haptène, va rendre les protéines du côlon ou du microbiote immunogènes pour le système immunitaire de l'hôte, activant les cellules T. Une dose unique de TNBS/DNBS entraîne une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par l'augmentation des cytokines de type Th1 dans les 2-3 jours post-instillation. Cette inflammation est dite aiguë car si l'instillation n'est pas renouvelée, l'inflammation diminue au cours du temps, jusqu'à disparaître. Cependant si des cycles répétés d'instillation sont mis en place, on peut alors parler d'inflammation chronique.

L'inflammation aiguë de la muqueuse est due à la production excessive de cytokines de type Th1 et Th17, incluant l'IFN-γ, le TNFα, l'IL-12 et l'IL-17 [235, 242]. En cas d'inflammation chronique, une exacerbation de cette réponse est observée [235]. Une infiltration de neutrophiles et de macrophages au sein de la muqueuse et de la sous-muqueuse est également observée [243]. Comme pour la MC, ce modèle provoque une atteinte profonde du tissu colique ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires dépendante des cellules CD4⁺T [244]. Ce modèle de colite chimio-induite est souvent utilisé pour l'étude de différents aspects de l'inflammation intestinale, incluant le profil de sécrétion des cytokines, les mécanismes de tolérance, d'adhésion cellulaire ou encore d'immunothérapie. Chez la souris, le processus inflammatoire induit par le TNBS/DNBS est hautement dépendant de la souche utilisée mais également de l'optimisation individuelle du protocole d'administration [243].

	RCH	MC	DSS	TNBS
Altération épithéliales	Erosions Apoptose	Apoptose	Ulcérations Apoptose	Nécrose Apoptose
Perméabilité intestinale	↑	↑	↑	↑
Occludine	↓	↓	↓	↓
Claudine 2	↑	↑		
Claudines 1 et 4		↔	↓	
Claudines 5 et 8		↓		
ZO-1			↓	
Mucus	Infecté	Altéré / Infecté	Infecté	Altéré
Flore bactérienne		Dysbiose		Dysbiose
Immunité	Th2 IL-13/TNF α	Th1/Th17 TNF α /IFN γ	Th2	Th1/Th17
Probiotiques VSL#3	Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire

Tableau 2. Récapitulatif des caractéristiques des MICI retrouvées dans les modèles murins.

D'après [55, 56, 237, 245-252]

CHAPITRE V :

LE TISSU ADIPEUX

I. Définition du tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) est largement connu et décrit pour son rôle central dans le contrôle de l'équilibre énergétique de l'organisme. Il stocke les réserves énergétiques sous forme de triglycérides au sein des cellules adipeuses que sont les adipocytes. Le TA représente à lui seul plus de 75% des réserves énergétiques, soit environ 10 à 15kg chez un jeune adulte de poids moyen. Dans cette dernière décennie la définition du TA a évolué d'un organe « inerte » de stockage, vers celle d'un organe hautement endocrine possédant la capacité de sécréter de nombreuses protéines et cytokines biologiquement actives, regroupées sous le terme d'adipokines ou adipo-cytokines [253]. Ces facteurs vont pouvoir agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine, conférant au TA la capacité d'être impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques [254].

La digestion du TA à l'aide de collagénase a permis de séparer les différentes cellules composant ce tissu et de les classer en 2 fractions : La fraction adipocytaire et la fraction stroma vasculaire, non adipocytaire [255]. Après digestion, les adipocytes gorgés de lipides flottent, à l'inverse des autres types cellulaires, présents dans la fraction stroma vasculaire, qui sédimentent.

I.1. L'adipocyte

L'adipocyte présente une forme sphérique caractéristique dont la taille peut varier de façon importante de 20 μm à 200 μm de diamètre [256]. L'adipocyte est spécialisé dans la synthèse et la mise en réserve des triglycérides (TG) (lipogenèse) en période d'excès calorique, et dans leur mobilisation sous forme d'acides gras libres (lipolyse) qui sont transportés vers d'autres tissus par le sang en période de jeûne. Les TG sont stockés au sein de l'unique vacuole lipidique de l'adipocyte. Cette dernière, pouvant représenter jusqu'à 95% du volume cytoplasmique, va repousser le noyau et le cytoplasme en périphérie contre la membrane plasmique de la cellule [257] (Figure 20). Un petit nombre de mitochondries est retrouvé près du noyau au sein de la mince couche de cytoplasme.

Les TG représentent environ 95% de la fraction lipidique. Des études utilisant des traceurs isotopiques ont pu montrer que les lipides étaient constamment mobilisés et renouvelés.

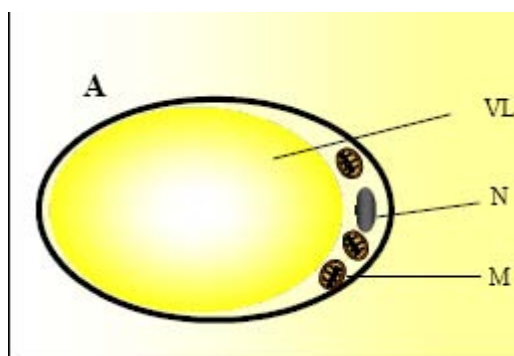


Figure 20. Schéma d'un adipocyte.

VL : Vacuole lipidique, N : Noyau, M : Mitochondrie.

Comme évoqué précédemment, les adipocytes sont capables d'augmenter considérablement leur diamètre (plus de 20 fois) ainsi que leur volume (plus de 1000 fois) en réponse à une accumulation de lipides afin d'assurer ce rôle de « tampon » de l'homéostasie énergétique. Dans ce cas, il s'agit d'hypertrophie adipocytaire. Cependant, les adipocytes sont incapables de dépasser une certaine « taille limite » déterminée par des facteurs génétiques spécifiques [258]. Des travaux récents ont mis en évidence que la taille des adipocytes était un facteur déterminant pour la sécrétion de plusieurs adipokines [259]. Les gouttelettes lipidiques, jusqu'à présent considérées comme des dépôts intra-cytoplasmiques inertes, pourraient participer à l'évaluation du stock de triglycérides [260]. Des études approfondies de la structure de ces gouttelettes montrent qu'il s'agit en réalité d'organites possédant une monocouche phospholipidique contenant du cholestérol, recouverte de périlipine et associée à une grande variété de protéines. Ces gouttelettes via l'ensemble des ses partenaires de surface pourraient être impliquées dans la perception du stock de lipides par l'adipocyte.

L'adipocyte mature est incapable de proliférer. Il a longtemps été décrit que l'augmentation de la masse du TA pouvait également résulter d'une augmentation du nombre d'adipocytes, on parle alors d'hyperplasie adipocytaire résultant de la différenciation des pré-adipocytes [261, 262]. Récemment Spalding et al ont remis en cause cette théorie démontrant que le nombre de cellules adipeuses restait stable au cours de l'âge adulte aussi bien chez des sujets minces qu'obèses [263]. En effet, le nombre total d'adipocytes serait déterminé au cours de l'enfance et de l'adolescence, restant stable par la suite. Le turn-over des cellules

adipeuses est estimé à 10% par an chez tous les sujets quels que soient l'âge et l'indice de masse corporel.

Bien que les adipocytes forment 35% à 70% de la masse adipeuse chez l'adulte, il n'en demeure pas moins que ces cellules ne constituent que 25% de la population cellulaire totale d'un dépôt adipeux. En effet, le TA est aussi constitué d'autres types cellulaires retrouvés dans la Fraction Stroma-Vasculaire (FSV) qui inclut des préadipocytes, des cellules endothéliales, des cellules hématopoïétiques (macrophages, lymphocytes,...), des cellules précurseurs ainsi que des cellules nerveuses. Les travaux menés sur la comparaison des capacités de production des adipokines, notamment les chimiokines et les cytokines, entre les adipocytes et la FSV ont mis en évidence que ces sécrétions étaient majoritairement dues aux cellules non adipocytaires.

1.2. La Fraction Stroma-Vasculaire (FSV)

Le pré-adipocyte :

Le pré-adipocyte est un type cellulaire qui présente un morphotype fibroblastique. Ce type cellulaire est à l'origine uniquement défini sur sa capacité à se différencier en adipocyte. De nombreux travaux ont été menés afin d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques de ce type cellulaire, mais à l'heure actuelle il n'en existe aucun. Le marqueur Pref-1 (preadipocyte factor-1) bien que non spécifique des préadipocytes, est couramment utilisé pour caractériser au mieux cette lignée cellulaire. En effet, alors que l'expression de cette protéine est abondante dans les préadipocytes, elle est complètement abolie au cours de la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures [264]. En 2006, Boulomier et al. ont réussi à isoler une population cellulaire au sein de la FSV capable d'acquérir un phénotype adipocytaire en présence d'un milieu stimulant l'adipogenèse, suggérant que les pré-adipocytes présents dans la FSV issue de tissu adipeux humain ont un profil CD34+/CD31-/CD14- [265]. Une proximité phénotypique importante entre les préadipocytes et les macrophages ainsi que la possibilité des préadipocytes à se transformer en macrophages ont été démontrées. En effet, des études de comparaison génique aussi bien au sein de lignées cellulaires que de culture primaire ont montré un profil similaire entre les préadipocytes et les macrophages, suggérant un lignage commun. De plus, des travaux ont montré que des préadipocytes injectés dans la cavité abdominale de souris Nude, acquièrent une activité

phagocytaire et l'expression de marqueurs spécifiques des macrophages comme le marqueur F4/80 [266].

Les cellules endothéliales :

Le TA étant un tissu richement vascularisé, il possède de nombreuses cellules endothéliales. Ces cellules sont caractérisées par les marqueurs CD34 et CD31 [267, 268]. Le pourcentage de ces cellules au sein de la FSV reste constant au cours de l'installation de l'obésité ce qui suggère la mise en place d'une néo-vascularisation parallèle au développement du TA [268]. Ces cellules jouent un rôle dans la croissance et le maintien de ce tissu.

Les cellules d'origine hématopoïétique :

Ces cellules sont caractérisées par l'expression du marqueur CD45. Deux populations cellulaires sont distinguables : les lymphocytes et les macrophages.

La présence de **macrophages** au sein du TA est décrite depuis 1965. L'infiltration macrophagique au sein du TA augmente au cours de l'obésité [269, 270] alors qu'elle diminue avec la perte de poids chez l'obèse [271]. Le rôle des macrophages au sein du TA reste encore très discuté. Deux populations de macrophages semblent co-exister dans le TA et plus particulièrement au cours du développement de l'obésité. Une première population M1 présentant un phénotype pro-inflammatoire et une deuxième population M2 présentant un phénotype anti-inflammatoire [272]. Les M1 pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée à l'obésité via la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires [272, 273]. *A contrario* les M2 permettraient, *via* leur expression du récepteur nucléaire PPAR γ , de maintenir la sensibilité à l'insuline [274, 275]. Le mécanisme expliquant la transition entre les populations M2 et M1 reste à déterminer. Un travail récent montre que l'expansion de la population M1 pourrait être favorisée chez des souris soumises à un régime gras [272, 276]. De nombreuses études restent à être menées pour comprendre notamment la dynamique entre les populations M1 et M2 et *in fine* déterminer si l'infiltrat macrophagique a des conséquences délétères sur la physiologie du TA.

Les cellules progénitrices :

La présence de cellules progénitrices dans le tissu adipeux humain est reconnue depuis les travaux de Bjorntop [277] sur l'évolution de la cellularité de la masse adipeuse avec le développement de l'obésité. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du marqueur

CD34 et l'absence du marqueur CD31. Une fois différenciées ces cellules peuvent présenter des activités fonctionnelles et métaboliques d'adipocytes matures [265]. D'autre part, elles peuvent également donner naissance à des cellules qui expriment des marqueurs phénotypiques de cellules endothéliales lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux adaptés [268]. De nombreux travaux ont montré par la suite que les cellules de la FSV issue de TA humain pouvaient acquérir *in vitro* des marqueurs biochimiques caractéristiques de lignages cellulaires variés : ostéogénique [278], chondrogénique [279], myogénique [280] entre autres. De plus, l'analyse des capacités de différenciation des cellules dérivant d'une cellule unique après de multiples passages, a montré que plusieurs clones cellulaires pouvaient se différencier en plusieurs lignages. Ces résultats suggèrent la présence de cellules souches adultes pluripotentes au sein du tissu adipeux humain [281, 282].

Les cellules nerveuses :

Le TA est principalement innervé par des fibres sympathiques. Les fibres noradrénergiques sont étroitement associées au réseau vasculaire et aux adipocytes. Le neurotransmetteur impliqué dans les messages nerveux du TA est la noradrénaline, qui se lie aux différents sous-types de récepteurs adrénergiques (récepteurs β_1, β_2 , et α_2 adrénergiques) régulant, entre autres, la lipolyse. Ces fibres nerveuses semblent aussi pouvoir moduler les processus de prolifération et de différenciation des pré-adipocytes et ainsi réguler l'évolution de la masse grasse [283, 284]. L'expression d'un troisième sous type β adrénergique plus spécifique de l'adipocyte, le récepteur β_3 , est très élevée par l'adipocyte de rongeur, mais moins par l'adipocyte humain. Ce récepteur possède également une activité lipolytique. Le traitement de rongeurs par un agoniste sélectif des récepteurs β_3 -adrénergiques induit une réponse lipolytique importante et exerce un effet anti-obésité et anti-diabétique [285]. A l'inverse, chez l'homme, l'agoniste β_3 -adrénergique a montré peu d'effet [286]. A ce jour, les essais cliniques se sont révélés assez décevants car les effets positifs observés par les agonistes β_3 étaient perdus après 1 mois.

1.3. La « régionalisation » du TA chez l'homme sain

Chez l'homme le tissu adipeux se répartit en de nombreux dépôts. Jean Vague et Robert Fenasse, dans l'édition du « Handbook of Physiology » sur le tissu adipeux de 1965, décrivent deux types de tissus adipeux blancs selon leur localisation : le TA sous-cutané (TASC) et le TA viscéral (TAV).

Le TASC : Comme son nom l'indique, il représente la graisse localisée entre les aponévroses musculaires et la peau mais aussi entre les fascias musculaires. C'est pour cela que ce tissu est souvent décrit comme « protecteur » des organes. De façon plus précise, il peut être divisé en TA sous cutané superficiel (graisse comprise entre les muscles et la peau) et TA sous cutané profond (localisé entre les muscles). D'un point de vue anatomique, ce tissu représente 80% du TA de l'organisme d'un individu sain et il est localisé au niveau du tronc, de la zone glutéo-fémorale et de la poitrine. Le TASC semble plus fréquent chez la femme (avant la ménopause) que chez l'homme. De cette répartition émerge le profil dit en forme de « poire » (Figure 21).

Le TAV : C'est un tissu profond qui entoure les viscères. Ainsi, ce TA interne est surtout retrouvé au niveau péritonéal (omental, mésentérique), retropéritonéal (périaortique, périrénal,...) mais également intrapelvien (gonadique et urogénital). Le TAV représente environ 20 et 5% de la masse grasse totale chez l'homme et la femme respectivement [287]. En effet, pour un même indice de masse corporelle ou une même masse grasse, l'accumulation de TAV est plus importante chez l'homme que chez la femme. De cette répartition émerge le profil dit en forme de « pomme » (Figure 21).



Figure 21. Profil de distribution des dépôts adipeux chez l'homme : profil poire/pomme

Jean Vague a été le premier à distinguer une répartition des dépôts adipeux différente selon le sexe et à y attribuer des pathologies associées distinctes [288]. De cette répartition émergera le profil pomme/poire (androïde/gynoïde) précédemment évoqué.

Le TA possède des caractéristiques propres à sa localisation anatomique qui sont influencées par l'âge et le sexe de l'individu. Chez la femme de poids normal, le TA est essentiellement localisé au niveau de la zone glutéo-fémorale ainsi qu'au niveau de la poitrine. Chez l'homme normopondéral, le TA se retrouve au niveau de la nuque et des lombaires.

Chez les deux sexes (plus marqué chez les hommes), le TA viscéral se retrouve surtout au niveau de l'omentum, du mésentère et de la zone rétropéritonéale ; dépôts qui, au cours de l'obésité, participeront à l'élaboration du syndrome métabolique.

Ces deux grands dépôts adipeux, sous-cutané et viscéral, montrent de nombreuses différences aussi bien au niveau du métabolisme, de l'expression et de la sécrétion des adipokines.

II. Les fonctions du TA

II.1. Le TA : un organe métabolique

La lipogenèse :

Elle désigne le processus permettant la synthèse d'acides gras, la finalité de la lipogenèse étant le stockage des lipides sous formes des TG dans la vacuole lipidique. La synthèse des TGs joue un rôle important dans le turn-over et le maintien de la taille des dépôts.

Le captage des AGL circulants :

Les TGs circulent sous forme de vésicules lipidiques synthétisées par l'intestin (chylomicrons) ou de lipoprotéines synthétisées par le foie (VLDL : Very Low density lipoprotein). La lipoprotéine lipase (LPL) présente dans la circulation sanguine va ensuite hydrolyser ces TGs circulants entraînant la libération d'acides gras qui vont ensuite être internalisés dans l'adipocyte par transport passif (pour les AGL à courte chaîne) ou par transport actif via les protéines de la famille des *fatty acid transport protein* (FATP).

La synthèse de novo d'acides gras:

Ce processus métabolique a lieu à partir des glucides (glucose) et peut aussi se produire dans le foie. Le glucose est, par la voie de la glycolyse, transformé en acétyl-coA qui est ensuite « greffé » à un malonyl-coA par l'action de la *fatty acid synthase* (FAS) et permet ainsi la synthèse d'un AG. Alors que la contribution de cette voie dans l'accumulation de triglycérides dans le TA est clairement démontrée chez le rongeur, elle semble beaucoup moins importante chez l'Homme

La réaction de ré-estérification des AG:

Une fois les AG néoformés ou captés de la circulation, une dernière étape permet la synthèse des TG par la liaison de 3 acides gras sur un squelette de glycérol phosphorylé en position 3. Cette réaction se produit en séquence, chaque AG étant greffé successivement par des enzymes spécifiques.

La lipolyse :

La lipolyse est définie comme l'hydrolyse enzymatique des graisses permettant de libérer des substrats énergétiques essentiellement sous forme d'acides gras libres aux tissus périphériques en cas de besoin énergétique de l'organisme. Le catabolisme des TG stockés dans les adipocytes aboutit à la libération des 3 acides gras (non estérifiés) et d'un glycérol (Figure 22). Plusieurs lipases interviennent de façon séquentielle dans cette hydrolyse des réserves lipidiques. Jusqu'à récemment le paradigme de cette régulation donnait à la lipase hormono-sensible (LHS) un rôle clé dans l'hydrolyse des TG. L'activation de la lipolyse est mise en jeu par les hormones ou les médiateurs activant le système adénylate cyclase (adrénaline, noradrénaline, glucagon) entraînant l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPcyclique. L'AMPc va phosphoryler la protéine kinase A, qui va elle-même activer la LHS en phosphorylant ses résidus sérine. En condition basale (non phosphorylée), la LHS est répartie au sein du cytoplasme ; lorsqu'elle est sous forme phosphorylée, la LHS migre du cytosol vers la surface des gouttelettes lipidiques.

Les périlipines sont des protéines très abondantes dans l'adipocyte mature. Elles entourent les grosses gouttelettes lipidiques et empêchent ainsi l'hydrolyse des lipides en bloquant l'accès des lipases à leurs substrats. Durant la lipolyse, la phosphorylation des périlipines entraîne un remodelage de la surface de la gouttelette qui permet l'accès de la LHS à ses substrats. La LHS va alors pouvoir cliver les TGs en diglycérides (DAG) puis les diglycérides en monoglycérides. La lipase des monoglycérides (LMG) dégrade ensuite les monoglycérides en glycérol et acides gras non estérifiés (Figure 22). Les souris déficientes en périlipine présentent une lipolyse de base élevée et un phénotype maigre.

La présence d'une lipase autre que la LHS a été mise en évidence simultanément par trois équipes travaillant sur des souris dont le gène codant pour la LHS a été inhibé. Cette lipase, l'adipose triglyceride lipase (ATGL), est majoritairement présente dans le cytoplasme et possède une très grande affinité de substrat pour les TG comparé aux DAG. L'hydrolyse des TG serait majoritairement dépendante de l'ATGL et accessoirement de la LHS (Figure 22). Cette dernière présente en effet une affinité dix fois supérieure pour les DAGs que pour les TGs [289].

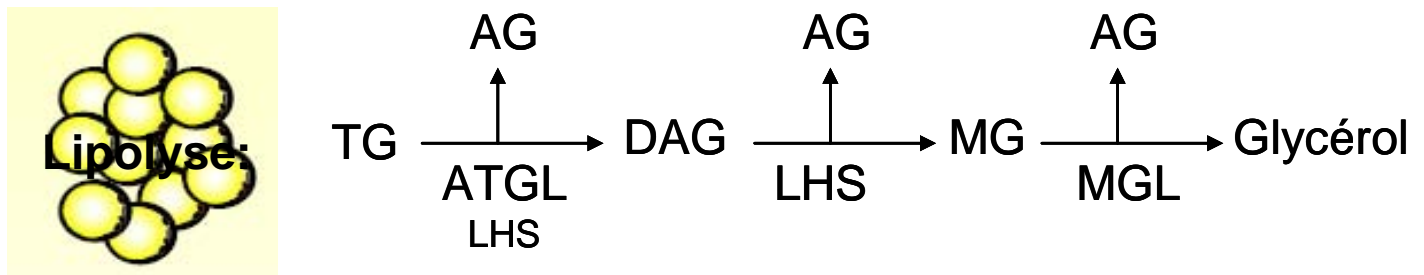


Figure 22. Schématisation des étapes de la lipolyse

II.2. Organe endocrine

Même si depuis 1964 les études de Rodbell ont montré que la LPL était sécrétée par les adipocytes [290], ce n'est réellement qu'en 1994 avec la découverte de la leptine, que le TA est reconnu comme un tissu sécrétoire [291].

La capacité du tissu adipeux à sécréter des molécules bioactives étant maintenant reconnue, l'adipocyte est considéré comme une cellule endocrine à part entière. On estime que les adipocytes sont responsables de 20% des sécrétions totales du tissu adipeux, la grande majorité des sécrétions du TA sont donc issues des différentes cellules constituant la FSV. Il est important de rappeler que le terme « adipokine » désigne les molécules, de nature souvent protéique et parfois lipidique, synthétisées et sécrétées par l'adipocyte [292]. A l'heure actuelle, environ cinquante adipokines ont été identifiées. Ces adipokines sont connues et définies comme étant impliquées dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme : le métabolisme glucidique et lipidique, l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline mais également l'inflammation (Figure 23).

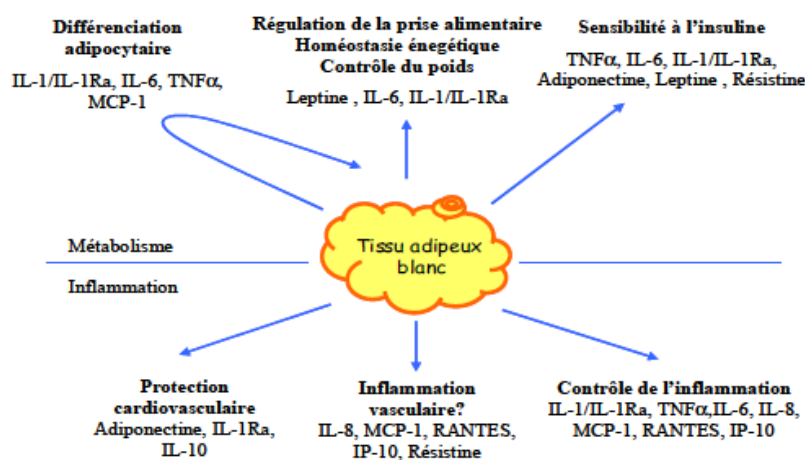


Figure 23. Implication des sécrétions du TA dans plusieurs processus physiologiques. D'après [293]

La leptine :

L'absence du gène codant pour la leptine (ob) a été identifiée comme responsable de l'obésité sévère observée chez les souris déficientes pour ce gène : les souris ob/ob. L'absence des récepteurs à la leptine chez les souris db/db entraîne également une forte obésité [291, 294]. La leptine tirant son nom du grec *leptos* (maigre) a été considérée comme inducteur de maigreur. La leptine peut exercer des actions aussi bien centrales que périphériques.

Au niveau central, la leptine est largement décrite pour son rôle majeur dans la régulation de l'équilibre énergétique. En effet, elle induit une diminution de l'expression du neuropeptide Y (NPY), un puissant stimulateur de l'appétit, entraînant une diminution de la prise alimentaire [295]. D'autre part la leptine augmente, via le système nerveux sympathique, la libération de tri-iodothyronine par la thyroïde, aboutissant à une augmentation de la dépense énergétique. Tout ceci aboutit à un bilan énergétique négatif et donc à une perte de poids.

Au niveau périphérique, la leptine agit sur les poumons, le rein, les muscles, les cellules pancréatiques mais également sur le TA lui-même. En effet la leptine stimule la lipolyse et inhibe la lipogenèse au sein du TA [296]. Des études ont montré chez la souris, qu'au sein du TA, seuls les adipocytes ont la capacité de sécréter la leptine. Chez l'homme, la sécrétion de cette adipokine est plus importante au niveau du TASC que du TAV [297]. De plus, le niveau circulant de leptine est corrélé à l'indice de masse corporelle, tout comme la sécrétion par les adipocytes est proportionnelle à la masse du TA [297]. Ainsi la taille des adipocytes et leur localisation anatomique sont des déterminants majeurs de la régulation de l'expression de la leptine.

La leptine fut initialement décrite comme une protéine spécifiquement synthétisée par l'adipocyte [298] mais il apparaît clairement maintenant qu'elle est également produite au sein d'autres tissus tels que le placenta [299], les muscles squelettiques [300] ou encore l'estomac [301] suggérant de nouvelles cibles pour cette protéine. La leptine est également retrouvée au niveau colique et plus particulièrement en condition d'inflammation [302]. La diversité des sites de synthèse et d'action de la leptine lui confère de nombreux effets. Elle agit sur la fertilité, la sensibilité des muscles à l'insuline, le transport de glucose... Au-delà des ses fonctions métaboliques et endocriniennes, la leptine est aussi un médiateur impliqué dans les réponses immunitaires et inflammatoires.

L'adiponectine :

Cette protéine a été identifiée simultanément par quatre équipes ce qui lui a donné de nombreuses appellations : Acrp30, adipoQ, apM1, GBP20. L'adiponectine est composée d'un

domaine globulaire et de domaine collagène. Une fois synthétisée, l'adiponectine forme des trimères qui vont ensuite pouvoir s'oligomériser et former des polymères composés de 4 ou 6 trimères [303]. Il existe donc une adiponectine de bas et de haut poids moléculaire. L'expression du gène codant pour l'adiponectine, *apm1*, est induite au cours de la différenciation adipocytaire et constitue le gène plus abondamment transcrit au sein du TA. La concentration plasmatique de l'adiponectine, 5mg/mL chez l'homme, montre que c'est une protéine circulante abondante en comparaison aux taux plasmatiques des autres adipokines (quelques ng/mL pour la leptine par exemple). Seul les trimères et les polymères sont présents dans la circulation.

L'adiponectine est essentiellement sécrétée par les adipocytes bien que Fain et al. [297] aient démontré une sécrétion d'adiponectine par les cellules de la FSV. Une des hypothèses est que l'adiponectine serait sécrétée par l'adipocyte, captée par les cellules de la FSV et libérée ultérieurement par ces cellules. Chez l'homme l'expression de l'adiponectine est légèrement supérieure dans le TASC que dans le TAV. Le taux d'adiponectine est plus bas chez les personnes obèses que chez les normo-pondéraux. Une corrélation inversement proportionnelle avec l'IMC a pu être démontrée. Au niveau métabolique, l'adiponectine joue un rôle prépondérant dans l'insulino-résistance. En effet, les souris déficientes en adiponectine développent une insulino-résistance [304] alors qu'une surexpression d'adiponectine chez des souris obèses et diabétiques (*ob/ob*) entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline [305] et une perte de poids.

L'adiponectine possède deux sous-types de récepteurs majoritairement exprimés dans le muscle (AdipoR1) et dans le foie (AdipoR2) ce qui implique un rôle important de cette adipokine dans ces organes cibles. Dans le foie, l'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des acides gras et diminue la formation de glucose à partir de glycogène ou d'acides aminés [306]. Au niveau du muscle elle entraîne également l'oxydation des acides gras et stimule l'utilisation du glucose [307]. L'administration d'adiponectine chez le rongeur améliore la sensibilité à l'insuline par ses actions sur le muscle et le foie [308]. Les effets de l'adiponectine ne se limitent pas au métabolisme glucidique, un rôle lui est reconnu dans les pathologies cardio-vasculaires et plus particulièrement dans l'athérosclérose. En effet, l'adiponectine inhibe l'adhésion des monocytes en diminuant l'expression des molécules d'adhésion, et inhibe l'accumulation de lipides au sein des monocytes empêchant ainsi leur transformation en cellules spumeuses. Les sujets ayant un taux d'adiponectine bas présentent une augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires [309, 310]. D'autre part, l'adiponectine est aujourd'hui considérée comme

une protéine clairement impliquée dans l'inflammation, son rôle pro- ou anti-inflammatoire sera discuté dans la partie VI.

L'interleukine-6 (IL-6):

La production adipeuse de l'IL-6 ainsi que sa concentration circulante est corrélée à l'indice de masse corporelle. L'IL-6 est sécrétée par de nombreux tissus mais un tiers du taux circulant a été estimé d'origine adipeuse. Au sein du TA la production de l'IL-6 par les adipocytes ne représente que 10% de la production adipeuse indiquant que ce sont essentiellement les cellules de la FSV qui sont responsables de cette sécrétion. Que l'on considère des adipocytes isolés ou le tissu entier, le TAV produit trois fois plus d'IL-6 que le TASC [311]. L'IL-6 est sécrétée par le TA à un niveau basal. In vitro, le TNF α peut augmenter 60 fois la production d'IL-6 dans des cellules différenciées 3T3-L1 (cellule adipeuse murine), indiquant que le taux d'IL-6 au sein du TA peut être modifié en condition inflammatoire. Au niveau métabolique il a été démontré que l'IL-6 avait une capacité à induire une insulino-résistance partielle [312]. D'autre part l'IL-6 inhibe l'activité de lipoprotéine lipase (LPL) [312] et induit la lipolyse. La production d'IL-6 par le TA péri-cardiaque pourrait provoquer un état inflammatoire local et ainsi entraîner des complications au niveau des artères coronaires.

Le TNF α :

Hotamisligil et al. ont été les premiers à montrer une expression adipocytaire de l'ARNm codant pour le TNF α dans différents modèles d'obésité chez la souris [313]. Des études cliniques ont ensuite révélé l'expression de TNF α dans le TA humain. Le TA des sujets obèses exprime 2,5 fois plus de TNF α que celui des sujets minces [314]. La sécrétion au niveau du TA est essentiellement due aux cellules de la FSV. La principale source de TNF α dans le TA serait les macrophages infiltrés au sein de ce tissu. En effet, une corrélation est établie entre le niveau d'expression du marqueur macrophagique CD68 et le niveau de sécrétion de TNF α [314] au sein du TAV.

Outre son rôle dans l'inflammation, le TNF α montre des effets métaboliques multiples. Au niveau du TA il réprime les gènes impliqués dans le stockage des acides gras (comme la LPL), ainsi que l'expression de cofacteurs impliqués dans l'adipogenèse et la lipogenèse. Comme l'IL-6, le TNF α est également un stimulateur de la lipolyse en induisant une diminution de TGs dans les adipocytes. Au niveau du TA, du muscle et du foie, le TNF α

diminue l'expression du transporteur de glucose GLUT 4 et la sensibilité à l'insuline, c'est pourquoi il a été proposé comme un élément majeur de l'insulino-résistance.

Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1:

Comme son nom l'indique, MCP-1 est une protéine qui permet le recrutement des précurseurs macrophagiques, les monocytes. L'expression basale de MCP-1 est en générale relativement faible, mais cette cytokine peut être induite par de nombreux stimuli comme l'IL-1, le TNF α ou encore le lipopolysaccharide (LPS). L'expression de MCP-1 a été détectée dans des processus inflammatoires associant une infiltration de cellules mononucléaires. Chez l'homme, le taux circulant de MCP-1 ainsi que son expression augmentent au cours de l'obésité [315]. L'expression de MCP-1 au sein du TA est essentiellement due aux macrophages présents dans la FSV [269], permettant ainsi le recrutement au sein du TA de nouveaux monocytes. L'expression de MCP-1 dans le TA péri-vasculaire pourrait jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose [316, 317] via le recrutement de monocytes pouvant après différenciation se transformer en cellules spumeuses. Cette idée est confortée par la diminution de la taille des plaques d'athérome ainsi que du nombre de macrophages chez des souris déficientes pour MCP-1 ou pour son récepteur [318, 319].

L'ensemble des ces adipokines et adipo-cytokines décrites ci-dessus seront rediscutées quant à leur implication dans les processus inflammatoires et plus particulièrement dans l'inflammation intestinale.

CHAPITRE VI :

LE TISSU ADIPEUX DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

I. Inflammation du tissu adipeux

Comme nous l'avons développé auparavant, le TA est un tissu hautement endocrine. L'idée que le TA puisse montrer un profil inflammatoire est issue des observations effectuées au cours de l'obésité. En effet, depuis peu un nouveau concept définit l'obésité comme un état inflammatoire chronique modéré. Cette nouvelle définition est basée sur l'augmentation du taux circulant de marqueurs pro-inflammatoires ou encore de protéines de la phase aiguë de l'inflammation chez les patients obèses [292]. Cependant, la question centrale reste liée à l'origine de ces marqueurs pro-inflammatoires circulants et à l'implication du TA dans ce phénomène. Les adipocytes, ou le TA, sont une source directe de molécules pro-inflammatoires. Ainsi, les variations des concentrations plasmatiques de ces molécules peuvent également être directement corrélées à une augmentation de la masse adipeuse.

Une élévation des taux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires, MCP-1, IL-6, IL-8, leptine, TNF α , et des formes solubles des récepteurs aux cytokines comme les TNF-R ou l'IL1R est également retrouvée au niveau plasmatique chez les patients obèses [320, 321]. De plus, dans la circulation des sujets obèses, une augmentation du nombre de leucocytes, de monocytes et des lymphocytes T et B mais sans variation de cellules NK a été rapportée [322]. Le tissu adipeux des sujets obèses produit une quantité élevée de cytokines comme le TNF α , l'IL-6, l'IL-1 β , le MCP-1 et il est le siège d'une accumulation de cellules immunes. Dans le tissu adipeux viscéral décrit pour être le tissu adipeux le plus impliqué dans les complications métaboliques, l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IL-8 et MCP-1) ainsi que des gènes relatifs à l'inflammation est augmentée [323].

Au-delà des modifications phénotypiques et métaboliques, le TA présente également une modification de l'expression et de la synthèse des adipo-cytokines. En effet, le TA est capable de répondre à un micro-environnement donné en régulant la sécrétion des adipo-cytokines. Ainsi, il s'agira ici de décrire le rôle du TA dans l'inflammation à travers l'implication des différentes adipo-cytokines dans la réponse inflammatoire.

1.1. Les adipokines : des médiateurs entre le tissu adipeux, l'inflammation et l'immunité.

L'adiponectine et la leptine sont les deux adipocytokines le plus abondamment produites par le TA. Mais nous avons vu précédemment que le TA produisait également de nombreuses cytokines comprenant le TNF α , l'IL-6 ou encore MCP-1. Ces médiateurs ont également un rôle bien connu et défini au sein du système immunitaire (Figure 24). Cependant lorsqu'ils sont sécrétés par le TA, ils présentent un rôle primordial situé à l'interface entre le système immunitaire et le système métabolique.

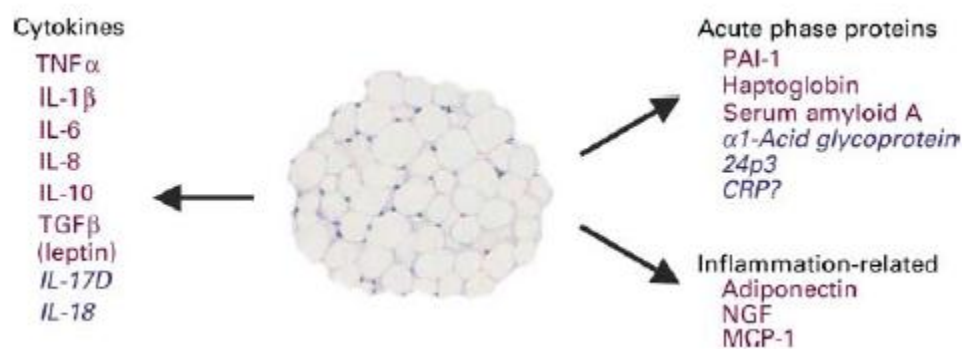


Figure 24. Sécrétions du TA impliquées dans l'inflammation
[292]

La Leptine:

Les souris déficientes en leptine (ob/ob) ou en récepteur à la leptine (db/db), présentent un panel d'anomalies immunitaires [324]. Les souris ob/ob présentent un thymus involué, des défauts dans la réponse des cellules T [325, 326] et une capacité réduite des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux cellules T. Chez l'homme, la déficience congénitale en leptine entraînant l'obésité, est associée à une lymphopénie et à une diminution de la réponse cellulaire T [327]. Cette adipokine agit aussi bien sur le système immunitaire inné que sur le système immunitaire acquis. Au niveau de l'immunité innée, la leptine est susceptible de réguler l'activation des neutrophiles en augmentant le chimiotactisme et l'activation des cellules présentatrices d'antigène par l'expression accrue des molécules du CMH, et des molécules d'adhésion impliquées dans la phagocytose. D'autre part, elle augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6 par les macrophages, mais également leur capacité de phagocytose (Figure 25). De plus, la leptine va jouer de manière positive sur l'activation, la prolifération et la migration des monocytes et sur

la cytotoxicité des cellules NK en augmentant leur synthèse de perforine (Figure 25) [328, 329].

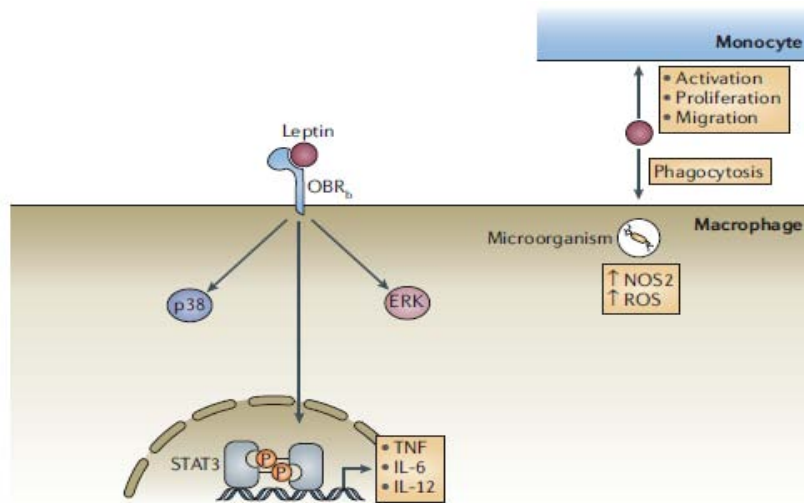


Figure 25. Effet de la leptine sur les macrophages et monocyte
[330]

Au niveau de l'immunité adaptative, la leptine régule la prolifération des cellules T naïves et inhibe leur apoptose. Elle peut aussi influencer la réponse Th1/Th2 en stimulant la production de cytokines Th1 (IFN γ , IL-2) et en inhibant la production de cytokines Th2 (IL-4) (Figure 27) [331]. Enfin, l'expression constitutive du récepteur à la leptine par les lymphocytes T et B est faible. Cette expression est régulée de manière positive (en terme de pourcentage de cellules exprimant ce récepteur et de densité du récepteur) en réponse à l'activation des cellules B, T et des macrophages [324]. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ issus de souris db/db présentent une capacité proliférative réduite par comparaison aux cellules issues d'animaux hétérozygotes, ce qui suggère que le récepteur à la leptine est important pour la prolifération et l'expansion des CD4⁺. Cependant, malgré les données *in vitro*, les résultats sur les modèles animaux et l'évidence d'un effet pro-inflammatoire, la manière dont la leptine influence les réactions inflammatoires chez l'homme reste encore à élucider [330].

L'adiponectine :

Le rôle de l'adiponectine dans l'inflammation reste encore largement débattu, bien que généralement cette adipokine soit considérée comme une molécule anti-inflammatoire. En effet les premières études ont montré un rôle anti-inflammatoire de l'adiponectine sur les cellules endothéliales via l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion induite par le

TNF α . De plus, les souris déficientes en adiponectine montrent des concentrations plus élevées de TNF α au niveau circulant et au sein du TA en comparaison à des souris contrôles [304]. L'adiponectine et le TNF α inhibent réciproquement leur production et antagonisent leur action dans le tissu adipeux [332, 333].

L'adiponectine inhibe la voie NF- κ B et interfère dans la fonction des macrophages. Un traitement à l'adiponectine de cellules macrophagiques en culture, entraîne une diminution des capacités de phagocytose de ces cellules, une diminution de la sécrétion de TNF α en réponse à une stimulation au LPS (Figure 26) [334], mais également une réduction de la réponse allogénique des cellules T [335]. De plus, sur les macrophages humains, le traitement à l'adiponectine induit la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou encore l'IL-1RA et supprime la production d'IFN γ en réponse à une stimulation par le LPS (Figure 27) [335]. L'adiponectine peut donc influencer la balance Th1/Th2 en stimulant la production de cytokines Th2 (IL-10) et en inhibant la production de cytokines Th1 (TNF α et IFN γ) (Figure 27) [330]. A l'heure actuelle les avis divergent sur la capacité de l'adiponectine à diminuer ou à augmenter la sécrétion d'IL-6 par les monocytes. De nouvelles études ont démontré que cette capacité dépendait de l'isoforme de l'adiponectine présente. En effet, l'adiponectine de bas et haut poids moléculaire partagent les mêmes effets biologiques sur les monocytes comme l'induction de leur apoptose, l'activation de la voie AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) ainsi que la suppression de l'expression des récepteurs scavengers au sein des macrophages [330, 336]. De façon différentielle, l'adiponectine de haut poids moléculaire induit la sécrétion d'IL-6 par les monocytes humains, alors que l'adiponectine de faible poids moléculaire a un effet anti-inflammatoire en diminuant la production d'IL-6 en réponse au LPS et stimule la synthèse de l'IL-10 par les monocytes [336]. Ces mécanismes différents seraient liés au fait que seule l'isoforme de haut poids moléculaire est capable d'activer la voie NF- κ B [336]. L'IL-6, quant à elle inhibe l'expression de l'adiponectine au sein de lignée cellulaire adipocytaire [333].

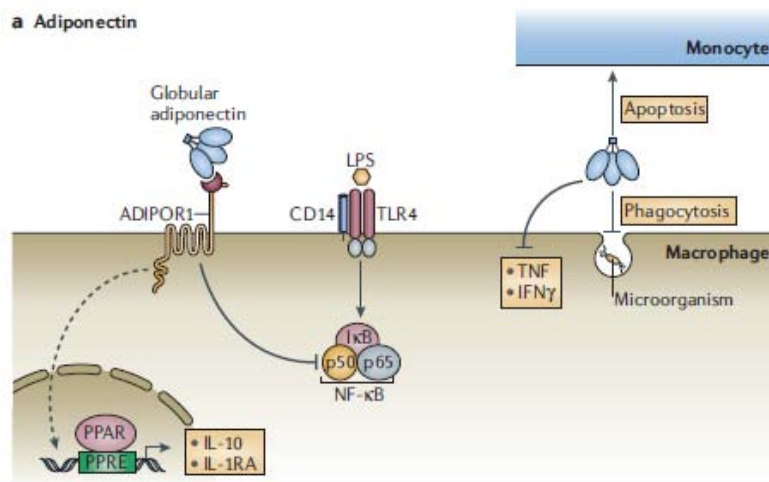


Figure 26. Effet de l'adiponectine sur les monocytes et macrophages.

L'adiponectine via son action sur son récepteur, inhibe le facteur de transcription NFκB, et la synthèse de TNFα et d'IFNγ. Elle induit également l'apoptose des monocytes et inhibe la capacité de phagocytose des macrophages. Par ailleurs, elle induit la sécrétion de l'IL-10. [330]

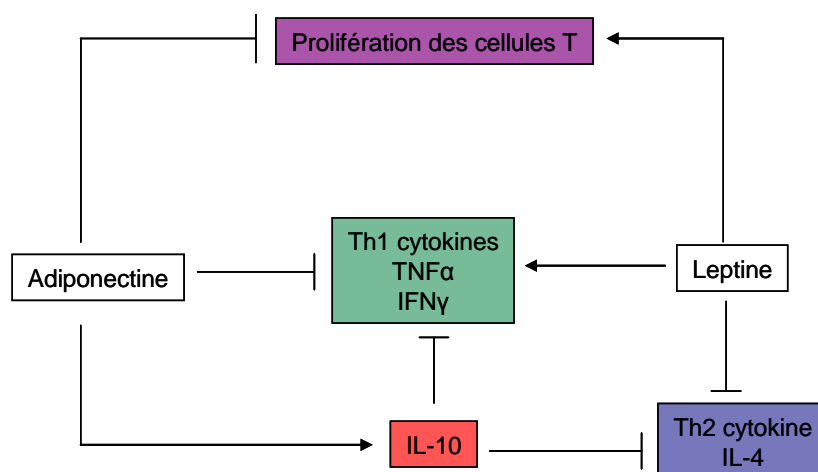


Figure 27. Implication de la leptine et de l'adiponectine dans la mise en place de la réponse Th1 ou Th2.

D'après [330]

En conditions inflammatoires, l'expression et la sécrétion des adipocytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF, l'IL-1β ou encore MCP-1 sont augmentées dans le TA. De plus, le nombre de macrophages présents au sein du TA augmente en fonction de l'état inflammatoire général.

Ainsi, chez les sujets obèses, une infiltration macrophagique importante au sein du TA a été montrée. Cet infiltrat de macrophages a également été corrélé à la taille des adipocytes et au degré d'obésité [269, 270]. La surexpression des gènes spécifiques de l'inflammation ou de

gènes marqueurs des macrophages et l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires sont essentiellement imputées aux macrophages infiltrés dans le TA plutôt qu'aux adipocytes eux-mêmes.

1.2. Les macrophages du tissu adipeux

Sur les 1300 gènes exprimés dans le TA, approximativement 30% sont spécifiques de l'inflammation ou des macrophages. L'origine de ces macrophages reste encore discutée ; toutefois deux mécanismes expliquant la présence importante de macrophages au sein du TA sont proposés :

Les macrophages présents au sein du TA peuvent être issus de la différenciation des pré-adipocytes [337]. En effet, le profil d'expression proche de ces deux types cellulaires suggère un lignage commun [266]. Par ailleurs, les pré-adipocytes d'origine humaine et murine possèdent une activité de phagocytose qui décroît lors de l'arrêt de leur prolifération et le début de leur différenciation adipocytaire. In vivo, 6h après injection de pré-adipocytes dans la cavité abdominale de souris Nude, la majorité de ces cellules a acquis une capacité de phagocytose et expriment les marqueurs spécifiques des macrophages tels que F4/80 et Mac-1 [266, 337, 338]. Cette « transdifférenciation » est stable, puisque les mêmes observations sont faites une semaine après l'injection.

Les macrophages du TA peuvent également être issus de la différenciation de précurseurs macrophagiques circulants. En effet, des expériences de transplantation de moelle osseuse chez la souris suggèrent que les macrophages du TA ne dérivent pas d'une différenciation *in situ* des pré-adipocytes mais plutôt des monocytes circulants [270]. Le TA est capable de sécréter des cytokines telles que le Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1, l'interleukine-8 (IL-8) ou encore le Colony Stimulating Factor (CSF)-1. L'expression de MCP-1 et d'IL-8 permet le recrutement des monocytes circulants, au sein du TA et la production de CSF-1 favorise un microenvironnement permettant la différenciation des monocytes et la survie des macrophages matures [270].

1.3. Toll like receptors (TLR) et tissu adipeux

Les TLRs reconnaissent les pathogènes et activent les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans la défense de l'hôte et l'immunité innée. Les pré-adipocytes ainsi que les adipocytes matures murins expriment une grande variété de TLRs (TLR-1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9). L'activation de ces récepteurs au sein du TA va entraîner la production de cytokines telle que l'IL-6. Les pré-adipocytes réagissent rapidement à la stimulation du TLR-4 par le LPS entraînant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF α et les chemokines (CCL-2, 5, 11) [339]. La réponse pro-inflammatoire est plus prononcée au sein des pré-adipocytes que des adipocytes matures. De plus, le maintien d'un état inflammatoire par une stimulation chronique au LPS inhibe la différenciation adipocytaire ainsi que l'expression des marqueurs adipogéniques, entraînant une accumulation de pré-adipocytes [340, 341]. La capacité de réponse pro-inflammatoire du TA au LPS semble plus dépendante de la réponse des pré-adipocytes que des adipocytes. Ces observations ont aussi bien été faites au sein du TA murin que du TA humain. Une administration par voie intraveineuse de LPS chez 20 patients sains montre une augmentation du taux plasmatique et de l'expression au sein du TA de TNF α et d'IL-6 [342]. La cascade de signalisation induite par le LPS au sein des adipocytes implique l'activation de NF κ B [343-345] (Figure 28f). Le traitement de souris par le LPS entraîne une diminution de l'adiponectine et une augmentation des marqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, MCP-1 et le TNF α au sein des TA périgonadiques, périrénaux et sous-cutanés [346].

L'expression du panel complet des TLRs fonctionnels au sein des adipocytes et pré-adipocytes permet de classer le TA comme un nouvel acteur de régulation du système de l'immunité innée, spécialement impliqué dans la réponse aux résidus microbiens (Tableau 3) [344].

	db/db PA	db/db A	ob/ob PA	ob/ob A	wt PA	wt A	3T3-L1 PA	3T3-L1 A	Human PA	Human A
TLR1									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	+	+	+	+		
Protein	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
TLR2									nd	+
mRNA	+	+	+	+	+	+	+	+		
Protein	+	+	+	+	+	+	+	+		
TLR3									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	+	+	+	+		
Protein	+	+	+	+	+	+	+	+		
TLR4									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	+	+	+	+		
Protein	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
TLR5									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	+	+	—	—		
Protein	+	+	+	+	+	+	—	—		
TLR6									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	+	+	+	+		
Protein	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
TLR7									nd	nd
mRNA	+	+	+	—	+	—	—	—		
Protein	+	+	+	—	+	—	—	—		
TLR8									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	—	—	—	—		
Protein	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
TLR9									nd	nd
mRNA	+	+	+	+	—	+	—	+		
Protein	+	+	+	+	—	nd	—	+		

Tableau 3. Expression des différents sous-types de TLR dans les différents dépôts adipeux, chez l'homme ou dans des modèles murins.
[344]

Ainsi le TA représente à la fois une source et une cible des médiateurs pro-inflammatoires grâce à sa capacité à synthétiser ces médiateurs et à exprimer des récepteurs spécifiques pour ces médiateurs.

1.4. Liens moléculaires entre le tissu adipeux et les macrophages

Il a été démontré, dans un système de co-culture et également dans un modèle de souris déficientes pour le TLR-4, que le $\text{TNF}\alpha$, les acides gras saturés et le TLR4 mettent en place une boucle d'auto-régulation entre les adipocytes et les macrophages [347, 348]. Le $\text{TNF}\alpha$ issu des macrophages induit la lipolyse au sein de l'adipocyte (Figure 28d) et inhibe la différenciation du pré-adipocyte via l'activation concomitante du récepteur au TNF et de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Figure 28a) [344]. La lipolyse entraîne une libération d'acides gras saturés comme l'acide palmitique ou stéarique (Figure 28b). Ces acides gras vont pouvoir activer le récepteur TLR-4 (Figure 28c) présents à la surface des macrophages entraînant l'activation de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ menant à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Figure 28e) [344]. Les souris mutantes pour le TLR-4 montrent une diminution de l'inflammation du TA en réponse à la mise en régime gras en comparaison à des souris contrôles [349].

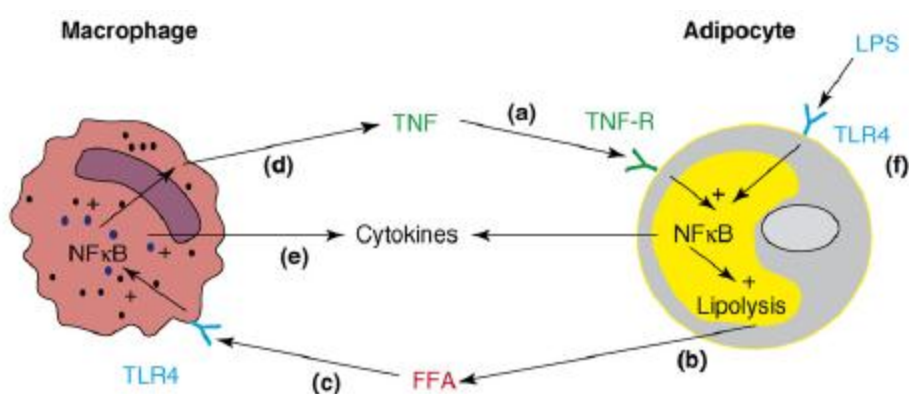


Figure 28. Mise en place au niveau du TA d'un « cross-talk » entre les adipocytes et les macrophages du TA.

Le $\text{TNF}\alpha$, des acides gras, le facteur $\text{NF}\kappa\text{B}$ et le récepteur TLR-4 sont les bases moléculaires de cette communication paracrine entre ces deux types cellulaires [344].

II. Modifications du tissu adipeux au sein des MICI

L'anorexie, la malnutrition, l'altération de la composition corporelle, la perte de poids ainsi que l'hypertrophie du TAV sont des caractéristiques reconnues dans les MICI et plus particulièrement de la MC. Cependant, au cours des 20 dernières années, sur les 6000 publications portant sur la MC, seul 0.2% d'entre elles mentionnent le terme « tissu adipeux » [350]. Les modifications du tissu mésentérique et du TAV observées chez les patients atteints de MC ont, jusqu'à aujourd'hui fait l'objet de peu d'investigation. Pourtant, depuis la description de cette maladie en 1932, l'augmentation de la masse du TAV ainsi que la présence d'un tissu gras rampant, couramment appelé « creeping-fat » (CF) ont été décrites, et sont utilisées par les praticiens pour évaluer l'extension et l'activité de la maladie [351].

II.1. L'hypertrophie du tissu adipeux viscéral dans la maladie de Crohn

Les sujets atteints d'une MC présentent une accumulation de graisse intra-abdominale dès le début de la maladie, indiquant que l'hypertrophie du TAV pourrait être une des bases physiopathologiques de la MC [352]. Bien que le TAV soit clairement lié au développement de désordres métaboliques, comme le diabète de type 2 ou les maladies coronariennes, dans la MC, son hypertrophie n'est pas corrélée à l'indice de masse corporelle ou à des anomalies métaboliques. Les analyses histologiques du TAV issu de patient souffrant de la MC révèlent une présence accrue de macrophages, un infiltrat de cellules T et un aspect fibreux de ce tissu [353, 354]. De plus, les adipocytes du TAV de patients atteints d'une MC sont significativement plus petits, mais plus nombreux que dans le TAV de patients sains [350, 351] (Figure 29). Ces observations montrent que l'augmentation de la masse grasse viscérale, observée chez ces patients, serait essentiellement due à une hyperplasie adipocytaire plus qu'à une hypertrophie des adipocytes. Cette augmentation de la masse viscérale observée chez les patients Crohn est exacerbée après un traitement à l'infliximab (anti-TNF α) suggérant une implication du TNF α dans la modification du TAV au cours de la maladie [355]. Ceci est cohérent avec la boucle de régulation décrite plus haut.

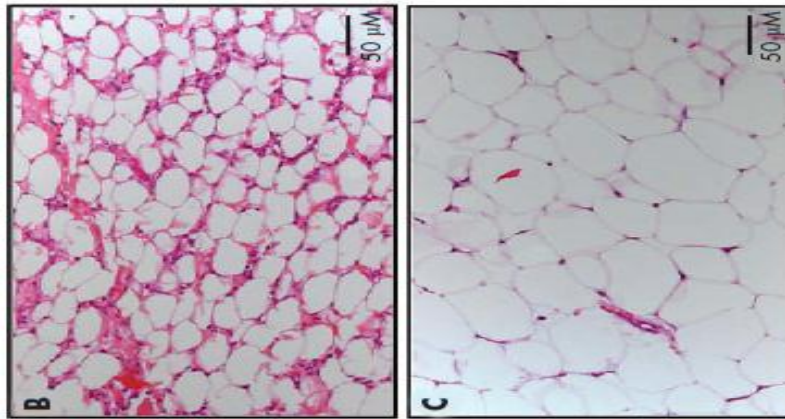


Figure 29. Aspect histologique du TA chez les sujets Crohn en comparaison au TA de sujets sains.

Le TAM issu de sujets atteints de la MC présente un nombre d'adipocytes plus important mais de taille réduite par rapport au TAM de sujets contrôle [350].

II.2. Le « creeping fat »

Le “creeping fat” (CF), ou TA rampant, a lui aussi été décrit dès 1932 lors de la description de la pathologie par Burrill Crohn et est considéré comme une caractéristique de la MC. Le terme « creeping » décrit un tissu d'aspect « adipo-fibreux » rampant autour des parties du tube digestif les plus atteintes par la maladie, gainant ainsi ces segments inflammatoires. En utilisant une description chirurgicale, Sheenan *et al* parlent de CF lorsque plus de 50% de la surface intestinale est recouverte par du TA [354]. La présence de ce CF s'observe uniquement du côté anti-mésentérique de l'intestin (Figure 30). Il peut recouvrir intégralement cette surface et entraîner la diminution de l'angle intestin-mésentère [350]. Le CF est retrouvé aussi bien au niveau de l'intestin grêle que du côlon et est corrélée avec l'ulcération, une inflammation trans pariétale, la formation d'agrégats lymphoïdes, l'épaississement de la paroi intestinale, la diminution du diamètre intérieur de l'intestin (sténose), une hypertrophie musculaire et une fibrose du tissu conjonctif [356]. Il a été montré que le CF est retrouvé chez 12 patients sur 16 opérés pour une résection iléo-caecale et chez 7 patients sur 11 opérés pour une résection colique [354]. Finalement une étude rétrospective comprenant 225 cas de résections a permis de réellement caractériser le CF comme spécifique de la MC puisqu'il n'est retrouvé dans aucune autre pathologie chez l'homme.

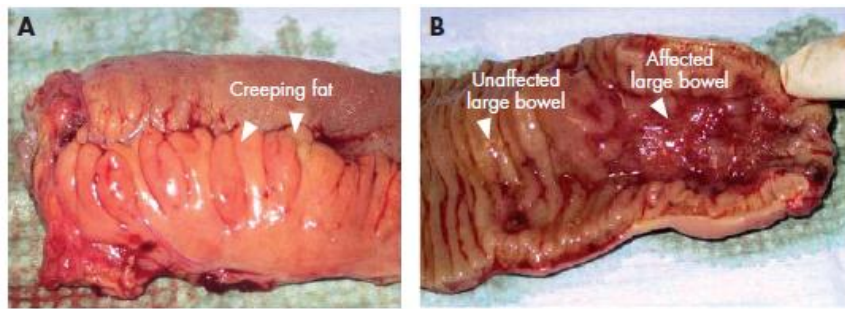


Figure 30. Le creeping fat dans un cas d'iléite de Crohn.

A : Le CF est signalé par les flèches. B : Dans la MC le CF se développe autour des zones ulcérées de l'intestin. [350]

III. Les adipocytokines dans les MICI

Comme nous l'avons décrit, de nombreuses recherches sont actuellement menées pour déterminer les interactions entre le TA, l'inflammation et l'immunité. Ces études sont plus particulièrement focalisées sur le rôle des adipocytokines dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. Il s'agira donc ici de décrire les modifications d'expression des adipocytokines chez les patients atteints de MICI aussi bien au niveau plasmatique que leur expression au sein du TAV et du CF.

III.1. La leptine dans les MICI

Chez l'homme :

Le rôle de la leptine dans l'inflammation semble associé à l'anorexie prolongée entraînant une perte de poids, ces deux critères étant des symptômes des MICI.

Les résultats des taux circulants de leptine chez les patients atteints de MICI sont controversés. La littérature rapporte des études montrant des taux inchangés [357-359] ou diminués [360] chez les patients atteints de MICI en comparaison à des sujets sains. L'équipe de Karmiris a également montré, que chez les patients atteints de MICI, le taux circulant de leptine est identique avant et après traitement à l'infliximab (anti-TNF α) [361]. Cependant, une autre étude a montré qu'un traitement à l'infliximab entraîne une augmentation de la leptinémie, suggérant une action majeure du TNF α comme inhibiteur de la production de leptine chez ces patients [362]. La littérature rapporte une expression de leptine plus importante au sein du TAV de patients atteints de MICI, que dans le TAV de sujets contrôles

[363]. Dans le même sens, la sécrétion de la leptine par le CF est supérieure à celle du TAV de patients contrôles [364].

Dans les modèles animaux :

Les souris ob/ob (déficiences pour la leptine), montrent une protection contre l'inflammation intestinale induite par un traitement au DSS ou au TNBS [365], suggérant la leptine comme un médiateur central dans l'inflammation intestinale. Une transplantation de TASC issu de souris sauvages chez des souris ob/ob traitées au DSS restaure un niveau d'inflammation colique identique à des souris sauvages également traitées au DSS [366]. De plus, il a été montré dans un modèle TNBS chez le rat que le taux circulant de leptine était augmenté dans les stades précoces de l'inflammation (1^{er} jour) en corrélation avec le degré d'inflammation colique [367]. Le TAV de rats ayant développés une colite après instillation de TNBS ne montre aucune variation de sécrétion de leptine [368]. Ainsi ces différentes données suggèrent une implication pro-inflammatoire de la leptine dans le développement de la colite expérimentale.

III.2. L'adiponectine dans les MICI

Chez l'homme :

Les différentes données bibliographiques quant à l'implication et à l'expression de l'adiponectine au cours des MICI portent encore à discussion. Alors que Karamiris *et al* montrent une augmentation du taux circulant d'adiponectine en conditions inflammatoires, inchangé après traitement à l'infliximab [360], Valentini *et al.* montrent une diminution de l'adiponectine dans le plasma de patients atteints de MICI [359]. L'expression, la production et la sécrétion d'adiponectine sont supérieures dans le TAV hypertrophié de patients atteints d'une MC que dans le TAV de patients atteints de RCH ou de cancer colique [369]. L'adiponectine est également sécrétée de manière plus importante par le CF que par le TAV des sujets contrôles (cancer colique) [364].

Dans les modèles animaux :

Au même titre que son implication dans l'inflammation est discutée chez l'homme, le rôle de l'adiponectine dans le développement d'une colite expérimentale l'est également. L'utilisation d'animaux KO a montré que la déficience en adiponectine pouvait être soit protectrice [370] soit délétère [371] dans le développement d'une colite chimio-induite, suggérant réciproquement un rôle pro et anti-inflammatoire de l'adiponectine. Une colite

induite au TNBS n'entraîne pas de modification de la sécrétion d'adiponectine au niveau du TAV mais une augmentation d'adiponectine par le tissu adipeux périnodal [368].

III.3. Les cytokines pro-inflammatoires:

Chez l'homme :

Les taux plasmatiques d'IL-6 et de TNF α sont plus élevés chez les patients atteints de MICI [372, 373]. Le taux de sécrétion d'IL-6 par le TAV et le CF semble inchangé chez ces patients [364], alors que celle du TNF α est supérieure que dans le TAV de patients contrôles [374]

Dans les modèles animaux :

Après une colite chimio-induite par le TNBS, le TAV des animaux est modifié et présente un profil inflammatoire avec une augmentation de l'expression et/ou de la sécrétion d'IL-6, de TNF α et de MCP-1 [368, 375]. Ce profil pro-inflammatoire est associé à une augmentation du marqueur macrophagique F4/80 au sein du TAV [376].

	Homme			Modèles animaux		
	TAV	CF	Plasma	TAV	CF	Plasma
Leptine	↑	↑	↔ ↓	↔	?	↑
Adiponectine	↑	↑	↓↑	↑	?	?
IL-6	↔	↔	↑	↑	?	↑
TNF α	↑	↑	↑	↑	?	

Tableau 4. Tableau comparatif de l'expression de la leptine, de l'adiponectine, de l'IL-6 et du TNF α au niveau plasmatique, du TAV et du CF chez l'homme et dans les modèles animaux de colite.

L'ensemble des études menées chez l'animal se concentre essentiellement sur l'étude du TAM. En effet, la présence de CF n'est décrite dans aucun des modèles animaux jusqu'à présent. Dans ce contexte, notre étude aura deux buts. Dans un premier temps, il s'agira d'étudier et de décrire les modifications du TAM dans deux modèles de colites chimio-induites de type modérées, induite au DNBS et au DSS (hyperémie, diarrhée, scores lésionnels macroscopiques inférieurs ou égaux à 4) et dans un modèle de colite de type sévère, induite au DNBS (ulcération, diarrhée, scores lésionnels macroscopiques strictement supérieurs à 4). Dans un second temps, nous allons mettre en place un modèle murin de colite

chimio-induite basée sur l'utilisation du DNBS, entraînant le développement d'un tissu « creeping-fat like », afin de mieux appréhender la nature et l'implication de ce tissu dans l'inflammation intestinale.

PARTIE 2

RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESULTAT 1 :

LES MODIFICATIONS DU TISSU ADIPEUX MESENTERIQUE AU COURS DE LA COLITE EXPERIMENTALE CHEZ LA SOURIS

(Soumis dans World Journal of Gastroenterology)

Introduction et but de l'étude:

Depuis ces dix dernières années le tissu adipeux est largement décrit comme un organe hautement endocrine. En effet, outre son rôle dans le stockage d'énergie, le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreuses molécules bioactives regroupées sous le terme d'adipokines. Un certain nombre de ces adipokines sont impliquées dans les mécanismes inflammatoires. De par ses sécrétions, le tissu adipeux mésentérique (TAM), entre autre, serait impliqué dans les pathologies inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique sont les deux principales formes de MICI. L'objectif de cette étude a donc été de décrire les modifications du TAM survenant dans deux modèles d'inflammation colique modérée.

Méthodes et Principaux résultats :

Deux modèles de colites chimio-induites ont été utilisés au cours de cette étude. 1) Chez des souris femelles balb/c, une colite a été induite par l'ajout de dextran sulfate sodium (DSS, PM : 36-50) à 4% dans l'eau de boisson durant cinq jours. 2) Chez des souris males balb/c, la colite a été induite par instillation intra-colique de 100µL d'une solution d'acide dinitrobenzène sulfonique (DNBS) à 260mg/kg dilué à 50% dans d'éthanol.

Une différence de la réponse inflammatoire colique dans les deux modèles a été observée ; avec une réponse plus importante obtenue dans le modèle DNBS comparée à celle obtenue dans le modèle DSS. Comme attendu, une inflammation colique illustrée par une perte de poids des animaux ainsi qu'une diminution de la longueur du côlon et une augmentation des scores lésionnels macroscopiques et de l'activité myeloperoxydase au niveau du côlon en comparaison à des animaux contrôles ont été observés dans les deux modèles de colites. De plus, l'inflammation digestive a été confirmée par l'augmentation du taux circulant d'IL-6.

Dans les deux modèles de colite, une diminution du poids du TAM, et de l'expression de l'ARNm codant pour l'adiponectine au sein de ce tissu a été observée. Chez ces animaux, un effondrement, des taux plasmatiques d'adiponectine et de triglycérides ont été observés. Seuls les animaux exposés au DSS ont montré une diminution de l'expression de la leptine au

niveau du TAM. *A contrario*, après exposition des animaux au DNBS et au DSS, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IL-6 et le F4/80 (marqueur des macrophages) a été observée au niveau du TAM. Seule une augmentation de l'expression de la MCP-1 au niveau du TAM dans le modèle DNBS a été constatée.

Conclusion :

L'induction d'une colite expérimentale chimio-induite dans deux modèles différents (DSS et DNBS) entraîne à la fois une diminution des marqueurs adipocytaires et une augmentation de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires au niveau du TAM chez la souris.

Ainsi, une perte du profil adipocytaire au profit d'un profil inflammatoire est observée au niveau du tissu adipeux mésentérique chez les animaux ayant développés une colite expérimentale modérée. Ces résultats soulignent donc que le tissu adipeux mésentérique pourrait jouer un rôle majeur dans l'inflammation intestinale.

Modifications of mesenteric adipose tissue during experimental colitis in mice

Isabelle Olivier^{1,2}, MSc, Vassilia Théodorou^{1,2}, PhD, Philippe Valet³, PhD, Isabelle Castan-Laurell³, PhD, Laurent Ferrier^{1,2,*}, PhD, Hélène Eutamène^{1,2,*}, PhD.

¹ INRA, UMR 1331, Toxalim, team “Neuro-Gastroenterology & Nutrition”, Toulouse, France,

² University of Toulouse, EI-Purpan, UMR 1331, Toxalim, team “Neuro-Gastroenterology & Nutrition”, Toulouse, France,

³ INSERM, I2MR, Adipocyte secretions, Obesities and associated Pathologies team, Toulouse, France

* these authors contributed equally

Address for correspondence

Dr Vassilia Theodorou
INRA, UMR1331 Toxalim
Team “Neuro-Gastroenterology and Nutrition”
180 chemin de Tournefeuille
BP 93173
31027 Toulouse Cedex 3
Phone : +33 561285140
Fax : +33 561285145
E-mail : vtheodor@toulouse.inra.fr

ABSTRACT

Background: Adipose tissue secretes various proteins referred to adipokines, being involved in inflammation. It was recognized that mesenteric adipose tissue (MAT) can be altered by inflammation, and pathologies such as inflammatory bowel disease (IBD). The aim of this study was to investigate the alterations of the mesenteric adipose tissue in two experimental models of colonic inflammation in mice.

Methods/Principal findings: In mice, colonic inflammation was obtained using two models of induced-colitis; by drinking DSS dissolved in water, or by intra-colonic instillation of DNBS. Observations of the colon and IL-6 plasma level determination, demonstrated that DNBS treatment lead to stronger inflammation. The expression of adipokines (leptin and adiponectin) and inflammatory markers (IL-6, MCP-1, F4/80) was studied by qRT-PCR in the MAT of treated and control mice. MAT was modified after DSS as after DNBS treatment. Indeed, colitis induced a decrease of mRNA encoding to leptin, adiponectin in MAT. In contrast, colonic inflammation induced an increase of mRNA encoding to IL-6, and F4/80, a specific marker of macrophage.

Conclusion: The mesenteric adipose tissue, in two model of colitis, shows a slight loss of adipose profile but an increased of inflammatory pattern, close to the one IBD patients. The modifications of MAT could be involved in pathophysiology of IBD.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis and Crohn's disease (CD) are the two most common forms of chronic IBD. The hallmark of IBD is chronicity and uncontrolled inflammation of the intestinal mucosa which can affect any part of the gastrointestinal tract [41]. The etiology of IBD still remains incompletely understood, but it is generally agreed that a complex interplay between genetic, environmental and immunological factors contributes to disease initiation and progression. Much of the recent progress in the understanding of IBD physiopathology has been made by the study of new experimental models of colitis [377]. A plethora of mouse model is now available to study IBD, including spontaneous, genetically engineered mice, congenic mice strain, and chemically-induced models [378]. The administration of dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water, and instillation with tri- or di-nitrobenzene sulfonic acid (DNBS) are commonly used to study the physiopathology of IBD [243]. Indeed, disruptions of epithelial cell as well as production of pro-inflammatory mediators in the colonic mucosa are two major mechanisms mediating disease in response to administration of DSS or DNBS as observed in IBD [379].

White adipose tissue (WAT) as long was described as a passive tissue that stores energy as triglycerides and releases this energy as free fatty acids. During the past 10 years, this point of view has totally changed and the adipose tissue is now also described like a real endocrine organ [253]. A wide variety of biologically active molecules are expressed and secreted by the adipose tissue [380]. All of these products are collectively referred to as adipokines. Many of these adipokines are inflammation-related proteins (interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1...) and the involvement of adipose tissue in inflammatory processes is now widely recognized [330]. Furthermore, it was shown that adipose tissue can be infiltrated by immune cells (macrophages) and that adipose tissue depots can be altered due to inflammatory pathologies such as IBD [350]. Low body weight and development of mesenteric adipose

tissue (MAT) hypertrophy are well described features of CD and are investigated for their contribution to CD [374].

In the present report, in the same study, we investigated the modifications in mesenteric adipose tissue induced by intestinal inflammatory response, triggered by DSS or DNBS administration in mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Nine weeks-old male Balb/c (weighting 23 ± 0.5 g) and seven weeks-old female Balb/c mice (weighting 20 ± 0.5 g) were used in this study. Mice had free access to water and food and were maintained in the pathogen-free animal facility at a constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12/12 hour light/dark cycle.

Animal care and work protocols were approved by the regional ethical committee of Midi-Pyrénées (Agreement #MP/01/45/11/08 and Agreement #MP/02/46/11/08).

Induction of colitis by 2,4 dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)

Colitis was induced by intrarectal administration of DNBS (Fluka, Saint Quentin-Fallavier, France) in male Balb/c. A stock solution of DNBS was prepared by dissolving 65 mg of DNBS in 1 ml of 50% ethanol, 50% saline solution. Mice were anaesthetized with ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg). Animals were instilled in the colon at 4cm from the anus, using a polyethylene catheter, with 100 μL of DNBS/ethanol solution. After the instillation, the mice were held upside down by their tails for 15s and received 0.2ml of saline (s.c) to prevent dehydration. Control mice were anaesthetized, and perfused with 100 μL of saline. The mice were sacrificed three days after the induction of colitis.

Induction of colitis by Dextran Sulfate Sodium (DSS)

To induce colonic inflammation in female Balb/c, mice received 4% DSS (mol wt, 36-50 kilodaltons; MP Biomedical, Illkirch, France) dissolved in drinking water for experimental days 1-5, followed by two days of regular drinking. The DSS solution was provided ad libitum. On day seven, mice were sacrificed.

Macroscopic analysis of inflammation

1-Mice body weight and colon length

The weight of mice was recorded the first and the last day of the experiment. The colon length was measured after the sacrifice.

2-Adipose Mesenteric Tissue depot dissection

MAT was defined as the adipose tissue surrounding the lymph nodes and around the caecum. Samples were directly frozen at -80°C.

3-Macroscopic damage scores

Immediately after sacrifice, the colon was removed and rinsed with saline. Intestinal damage was scored according to a modified scale of Wallace *et al* [381]. Briefly, the presence of mucosal hyperemia and bowel wall thickening, the severity and extent of ulceration and necrosis, the tissue adhesion, and the occurrence of diarrhoea were rated according to a macroscopic damage score (MDS) ranging from 0 (normal appearance) to 4 (inflamed lesions).

Myeloperoxidase activity

The measurement of myeloperoxidase (MPO) activity, a marker of polymorphonuclear primary granules, was measured in the colon and in adipose tissue (mesenteric adipose tissue and creeping fat), as described previously. The totality of tissue (colon or adipose tissue) was suspended in potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 44mM, K_2HPO_4 6 mM, pH 6.0), homogenized on ice with Polytron (PCU-2, Kinematica GmbH, Lucerne, Switzerland) and submitted to 3 cycles of freezing and thawing. Homogenates were then centrifuged at 10000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (0.5% (wt/vol) in potassium phosphate buffer) to release MPO from polymorphonuclear neutrophil primary granules. These suspensions were sonicated (Büchi, Flawil, Switzerland) on ice and centrifuged at 10000 rpm for 15 minutes at 4 °C. Supernatant

fractions were diluted in potassium phosphate buffer containing 0.167 mg O-dianisidine dihydrochloride/ml and 0.00005% (vol/vol) H₂O₂. MPO from human neutrophils (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France; 0.1 U/ml) was used as a standard. Changes in absorbance at 450 nm were recorded with a spectrophotometer every 10 seconds over 2 minutes. One unit of MPO activity was defined as the quantity of MPO degrading 1 μ mol H₂O₂ min⁻¹ml⁻¹ at 25 °C. Protein concentrations (mg/ml) were determined using a modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, BioRad, Ivry/Seine, France) and MPO activity was expressed as MPO units/g protein.

Plasmatic assays

Plasma from control animals and treated mice were collected. Samples were then processed for ELISA using commercial kits to determine plasma levels of triglycerids, IL-6 and adiponectin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturers' protocols, and data were expressed as concentration per mL (IL-6) or μ L (triglycerids and adiponectin) of plasma.

mRNA expression by real-time RT-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen Courtaboeuf, France) and 500 ng were reverse-transcribed for 60 min at 37 °C using Superscript II (SSII) reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamers. A minus reverse transcriptase reaction (without SSII) was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real time PCR was performed with 25 ng of cDNA in a final volume of 20 μ L using the SYBR Green TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fluorescence was monitored and analyzed in a GeneAmp 7500 detection system instrument (Applied Biosystems). Analysis of 18S ribosomal RNA was performed in parallel using the ribosomal RNA control TaqMan assay kit (Applied Biosystem) to normalize gene expression. Results are expressed as $2^{(Ct_{18S} - Ct_{gene})} [1 - (1/2^{(Ct_{gene} -$

$10^{Ct/RT}) \times 100,000$, where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. All primers used (Table 1) were validated for PCR efficiency.

Data analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) was used. Between-group comparison within groups was performed by Student's paired t-test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

Colitis characterization induced by DSS or DNBS.

The colonic inflammation was evaluated and compared in two mice models of colitis obtained after DSS or DNBS treatment. To assess this colonic inflammation, we evaluated body weight, colon length, macroscopic damage score (MDS) and colonic myeloperoxidase (MPO) activity in these two models. Similar body weight loss and colon shortening compared with respective control animals were observed in the two models (**fig 1A and 1B**). An increase of macroscopic damage score and of colonic MPO activity was observed in treated mice in comparison to controls mice (**fig 1C and 1D**). However, colonic tissue in DNBS mice showed a significantly higher MDS and MPO activity than in DSS mice (respectively: 1.9 vs. 3.2 MDS $p < 0,001$ and 903.7 vs. 1735.0 U MPO/g of protein $p < 0,05$) (**fig 1C and 1D**).

Plasma and MAT modification of adipose marker expression in inflamed conditions

After dissection, the mesenteric adipose tissue (MAT) was weighted. Treated mice showed a decrease of MAT mass compared to control mice (**fig 2A**). The DSS and DNBS treatment led also to a decrease of plasma triglycerides level compared with controls (**fig 2B**). Moreover, plasmatic assay of adiponectin revealed lower level of this adipokine in colitis mice (DSS and DNBS) in comparison with control mice (**fig 2C**). The mRNA expression of adipokines, *i.e* adiponectin and leptin, was studied in MAT by RT-qPCR. The colonic inflammation induced by DSS and DNBS led to a decreasing of the expression of mRNA encoding to adiponectin (**fig 2D**). In the same way, the expression of mRNA encoding to leptin was also decreased in MAT, but only after DSS treatment (**fig 2E**). Indeed, the MAT obtained in DNBS mice showed the same expression pattern of leptin that MAT obtained in control mice (**fig 2E**).

Inflammatory status of MAT

DSS and DNBS treatments were used to lead to chronic intestinal inflammation. Inflammatory status of animals was evaluated by MDS and colonic MPO activity but also by IL-6 plasmatic assay. IL-6 plasma level was significantly higher after treatment by DSS or DNBS, in comparison to IL-6 plasma level observed in control mice (**fig 3A**). The mRNA expression level of genes encoding to pro-inflammatory molecules were measured in MAT of treated or control mice by RT-qPCR. The mRNA expression level of IL-6 was higher in the MAT of colitis mice (DSS and DNBS mice) compared with MAT of control mice (**fig 3B**). The level of mRNA encoding to MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) was only higher in MAT of mice treated with DNBS (**fig 3C**). In deed, the MAT of DSS and control mice showed the same rate of MCP-1 mRNA expression (**fig 3C**). Study of mRNA encoding to F4/80, a widely used marker of activated macrophage, was also performed. In the two models of colitis, MAT showed an expression level of F4/80 significantly increased in comparison with expression observed in control MAT (**fig 3D**).

DISCUSSION

In this study we analyzed and compared the modifications of mesenteric adipose tissue (MAT) in conditions of colonic inflammation. Thus, two common models of chemically induced colitis were used: DSS and DNBS treatment. As expected and recognized in the literature these two models lead to a colonic inflammation described by body weight loss and colon shortening but also by an increase of macroscopic damage scores and colonic myeloperoxidase activity. As expected, the inflammatory status of animals was confirmed by an increase of IL-6 plasma level after colitis induction. All these parameters showed that intra-colonic DNBS instillation induce an inflammation slightly stronger compared to DSS colitis. Nevertheless, colonic inflammation did not present MDS higher than four and thus, referred in our precedent study [382], they can be defined as moderate inflammations.

In these two models, body weight loss is associated to a decrease of MAT mass. Moreover, in the end of DSS or DNBS treatment, triglyceride plasmatic level was clearly decreased. These results are in accordance with the results obtained by Melgar *& al* in DSS-induced colitis in C57 Bl/6 mice, showing a decreased food intake and plasmatic level of TG [383, 384]. In inflamed conditions, MAT from DSS and DNBS mice displays a loss of the adipose profile, assessed by a decrease of leptin and adiponectin expression. The decrease of leptin expression in after DSS treatment is in line with decreased plasma level observed after DSS treatment [383]. Since, the leptin is produced in direct proportion to adipose tissue mass [259], the diminished of leptin expression in MAT can be explained by this lower MAT mass observed in this context. Moreover, we have shown that mRNA expression of adiponectin was lower in MAT of treated mice, in line with decreased plasma levels. These results are in the same way that our recent work, showing that in severe colitis (*i.e* with MDS>4), the expression of leptin and adiponectin decreased in MAT [382]. Moreover, these data are consistent with studies of

Mattacks *et al.* which described a decrease of lipid markers in MAT in a model of TNBS-induced colitis [384].

We found profound inflammatory changes in MAT of DSS and DNBS-treated mice with increased expression of several mRNAs encoding inflammatory markers. In treated mice, expression of gene encoding to IL-6 was increased in MAT. The literature points out that, *in vitro*, IL-6 has been shown to inhibit adiponectin expression and secretion [385]. The increase of IL-6 in colitic mice could explain the weaker expression of adiponectin in MAT and lower plasma level. In addition, IL-6 is known to reduce food intake, resulting in weight loss [386] as observed in our work. The monocyte migration to adipose tissue is believed to be dependent upon monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and MAT is a depot with a high MCP-1 production ability [387]. Accordingly, we have shown that DNBS intra-colonic instillation leads to an increase MCP-1 expression in MAT. These results are consistent with the literature. Indeed, as referred by Karagiannides *et al.* [375] in a close model of TNBS-induced colitis in rat, the induction of colitis causes inflammatory response in MAT illustrated by an increase of IL-6 and MCP-1 in adipose tissue.

During intestinal inflammation, MAT is infiltrated by significant amounts of macrophages, being recognized as a pathophysiological feature of Crohn's disease [364]. The expression of F4/80, a macrophage marker, was increased in MAT of mice with colitis (DSS and DNBS), demonstrating that macrophages are accumulated in this adipose depots. These results are in accordance with F4/80 increase in other studies inducing a moderate [375, 388, 389] or a severe colitis [382].

In conclusion, our present data illustrate that MAT modifications occur during a moderate inflammation. Interestingly; these modifications are linked to the inflammatory status, but not to the chemical use, *i.e* DNBS or DSS. The abundance of pro-inflammatory cytokines

expression in the MAT during colitis suggests that this adipose depot could participate in the inflammatory response contributing to the development and progression of IBDs.

1. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
2. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 260-76.
3. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
4. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
5. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease*. Int J Colorectal Dis, 2000. **15**(3): p. 144-60.
6. Mohamed-Ali, V., J.H. Pinkney, and S.W. Coppack, *Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1998. **22**(12): p. 1145-58.
7. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 329-39.
8. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.
9. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. **56**(4): p. 577-83.
10. Desreumaux, P., et al., *Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(1): p. 73-81.
11. Wallace, J.L., et al., *Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy*. Gastroenterology, 1992. **102**(4 Pt 1): p. 1176-85.
12. Olivier, I., et al., *Is Crohn's creeping fat an adipose tissue?* Inflamm Bowel Dis.
13. Melgar, S., et al., *Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G165-72.
14. Mattacks, C.A., D. Sadler, and C.M. Pond, *The cellular structure and lipid/protein composition of adipose tissue surrounding chronically stimulated lymph nodes in rats*. J Anat, 2003. **202**(6): p. 551-61.
15. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
16. Fasshauer, M., et al., *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **301**(4): p. 1045-1050.
17. Wong, S. and J. Pinkney, *Role of cytokines in regulating feeding behaviour*. Curr Drug Targets, 2004. **5**(3): p. 251-63.
18. Yu, R., et al., *Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(8): p. 1353-62.
19. Karagiannides, I., et al., *Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5207-12.
20. Paul, G., et al., *Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(6): p. 471-7.
21. de Oliveira, C.C., et al., *Depot-specific alterations to insulin signaling in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammatory response*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(4): p. 396-402.

22. Thomaz, M.A., et al., *Methotrexate is effective in reactivated colitis and reduces inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammation.* Pharmacol Res, 2009. **60**(4): p. 341-6.

Figure 1

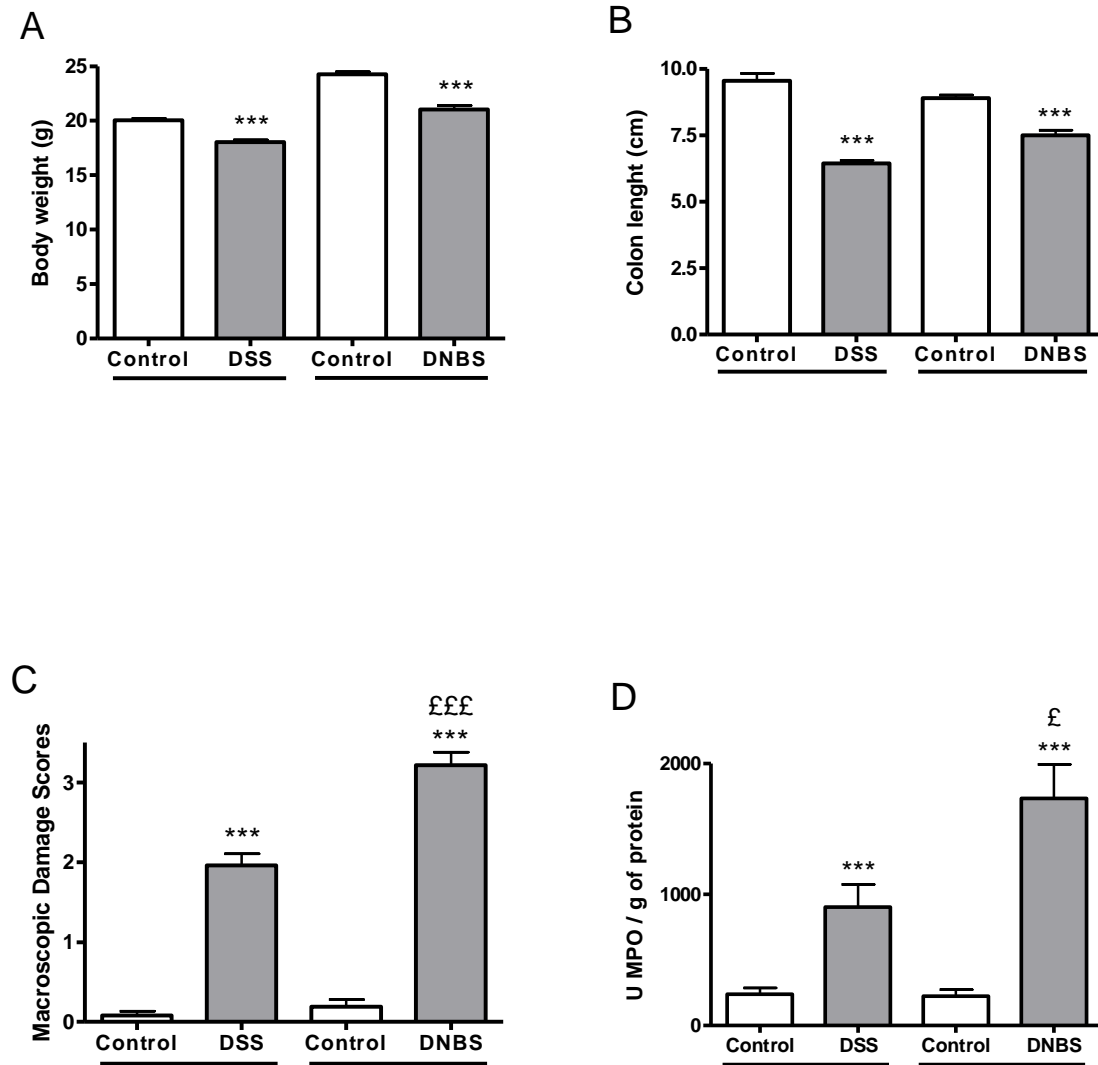


Figure 1: Colitis characterization

Body mass (1A), colon length (1B), colonic macroscopic damage scores (1C) and colonic myeloperoxidase activity (1D) were evaluated in both DSS and DNBS-induced colitis and also in control mice. The white bar corresponds to respective control mice and grey bar to treated mice (DSS or DNBS). Data are expressed as means \pm SEM (n=15), ***P<0.001 vs. respective control and £ P<0.05, £££ P<0.001 vs. DSS mice.

Figure 2

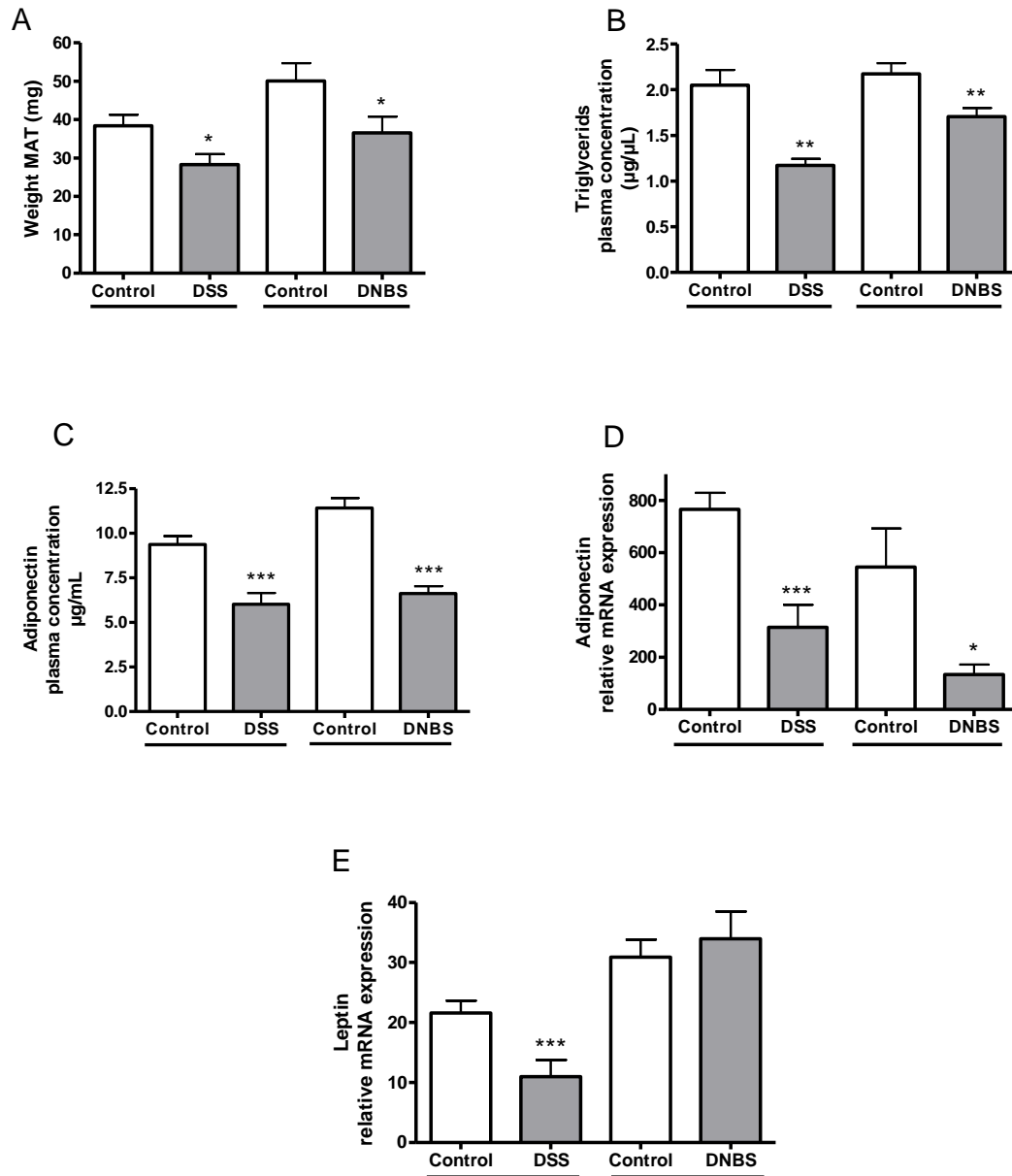


Figure 2: Characterization of mesenteric adipose tissue (MAT) in colitis conditions. After dissection MAT was weighted (2A). Triglycerides and adiponectin plasma concentration were quantified by ELISA in control and colitis mice (**respectively 2B and 2C**). Messenger RNA encoding to adiponectin (2D) and leptin (2E) were quantified by real time RT-qPCR in both MAT of control and colitis mice. The white bar corresponds to respective control mice and grey bar to treated mice (DSS or DNBS). Data are expressed as means \pm SEM (n=10 to DSS and respective control and n=6 to DNBS and respective control), *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001 vs. respective control.

Figure 3

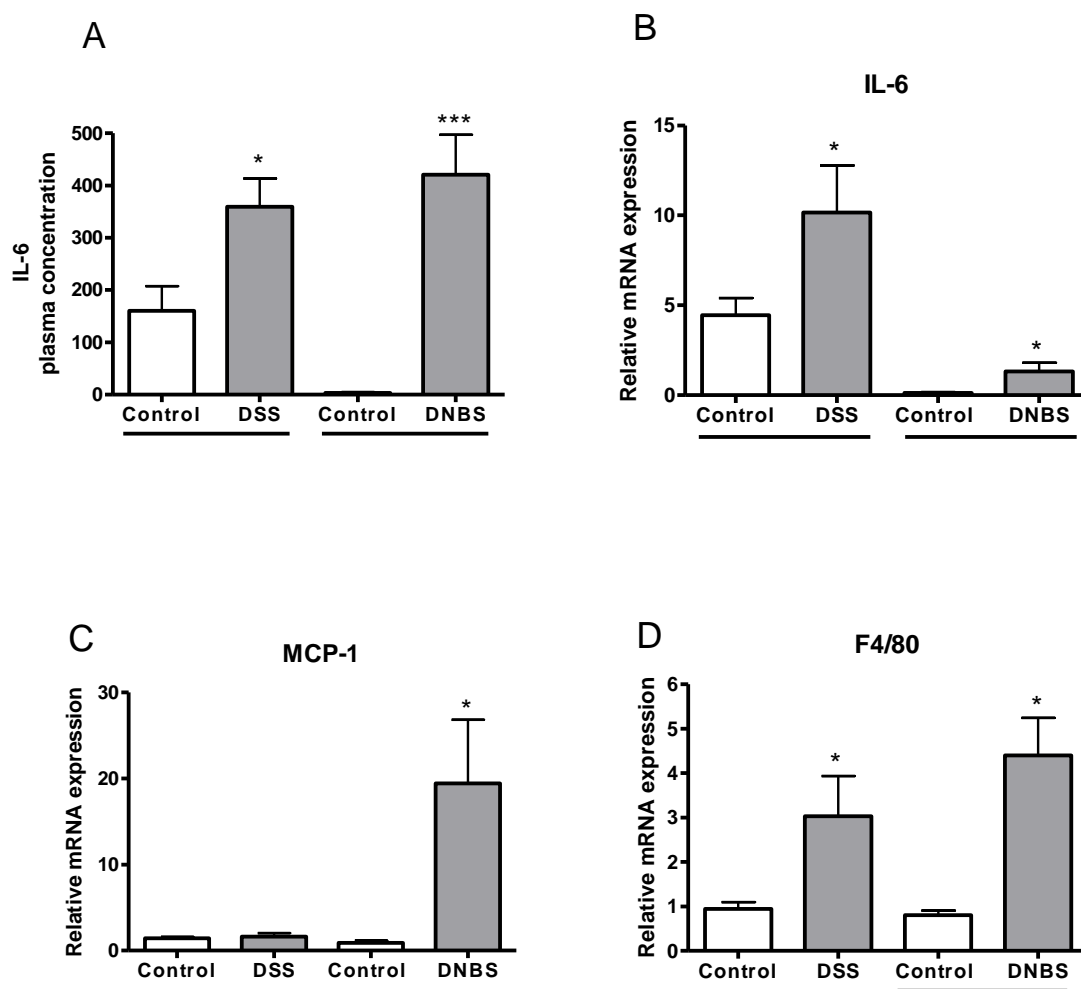


Figure 3: MAT an inflammatory tissue in colitis conditions

IL-6 plasma concentration was quantified by ELISA in control and colitis mice (3A) (n=10). Messenger RNA encoding to IL-6 (3B), MCP-1(3C) and F4/80 (3D) were quantified by real time RT-qPCR in both MAT of control and colitis mice. The white bar corresponds to respective control mice and grey bar to treated mice (DSS or DNBS). Data are expressed as means \pm SEM (n=10 to DSS and respective control and n=6 to DNBS and respective control), *P<0.05, ***P<0.001 vs. respective control.

RESULTAT 2 :

LE CREEPING-FAT, UN TISSU ADIPEUX?

(Accepté dans [Inflamm Bowel Dis.](#) 2011 Mar;17(3):747-57)

Introduction et but de l'étude :

La maladie de Crohn (MC), décrite en 1932 par le Dr Crohn lui-même, est une des deux grandes formes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les patients atteints de la MC présentent une hypertrophie du tissu adipeux mésentérique ainsi qu'un tissu ectopique appelé « creeping-fat » se développant du côté anti-mésentérique et enveloppant les zones inflammatoires intestinales ulcéreuses. Les praticiens utilisent ce tissu comme un marqueur de la gravité de la pathologie. Bien que le creeping-fat soit couramment décrit comme une extension du tissu adipeux mésentérique, peu d'études se sont réellement intéressées à la nature de ce tissu. Le manque de connaissance sur le creeping-fat est en partie lié à l'absence de modèle préclinique permettant son étude. Dans un premier temps, le but de cette étude était de mettre en place un modèle murin de colite expérimentale entraînant le développement de creeping fat, et dans un deuxième temps de décrire la nature du tissu adipeux mésentérique et du creeping fat dans ce modèle de colite.

Méthodes et principaux résultats:

Trois jours après l'instillation intracolique d'une forte concentration de DNBS (260 mg/kg ; 50 % éthanol), 40% des souris ont développé une inflammation colique sévère caractérisée par des scores lésionnels macroscopiques supérieurs à 4 et la présence d'un CF-like entourant les parties ulcérées du côlon.

Les études géniques et protéiques du tissu adipeux mésentérique (TAM) des souris développant du CF ont montré une diminution des marqueurs métaboliques comme la lipase hormono-sensible (LHS), des marqueurs adipocytaires comme la périlipine et de certaines adipokines comme la leptine et l'adiponectine. Dans ces conditions inflammatoire colique sévère, le TAM a également montré un profil inflammatoire avec une augmentation de l'expression génique des marqueurs tels que MCP-1, IL-6 et F4/80 (marqueur macrophagique).

Les études histologiques, géniques, et protéiques ont permis de décrire le CF-like comme un tissu non adipeux, mais fibreux et inflammatoire en comparaison au TAM issu des mêmes

animaux. En effet, une expression quasi nulle des mêmes marqueurs métaboliques, adipocytaires et des adipokines ont été observées au niveau du CF-like. De plus, les études lipidomiques et protéiques ont suggéré une cellularité plus importante dans ce tissu. Une expression importante de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, ainsi que des marqueurs de fibroblastes, de neutrophiles et de macrophages ont été mesurés dans le CF. L'étude des CF issus de trois sujets atteints de la maladie de Crohn, a permis de révéler un profil similaire au CF-like murin avec une moindre expression de leptine, d'adiponectine, et de LHS comparé au TAM de ces mêmes patients.

Conclusions :

Ces résultats ont permis de mettre en place un modèle original et standardisé de colite expérimentale induisant l'apparition de creeping-fat. Le développement de CF-like est corrélé à la sévérité de la colite et forme une gaine autour des zones ulcérées de l'intestin.

Pour la première fois, le creeping fat est caractérisé comme un tissu non adipeux mais fibreux et inflammatoire. Outre, le fait que ce modèle ait permis de caractériser la nature du creeping fat, ce modèle offre également la possibilité d'étudier le rôle du creeping fat dans la physiopathologie de la maladie de Crohn.

Is Crohn's Creeping Fat an Adipose Tissue?

Isabelle Olivier, MSc,* Vassilia Théodorou, PhD,[†] Philippe Valet, PhD,[‡] Isabelle Castan-Laurell, PhD,[‡] Hervé Guillou, PhD,[§] Justine Bertrand-Michel, PhD,[¶] Christel Cartier, MSc,* Valérie Bezirard, MSc,* Robert Ducroc, PhD,^{||} Jean-Pierre Segain, PhD,** Guillaume Portier, MD,^{††} Sylvain Kirzin, MD,^{††} Jacques Moreau, MD,^{‡‡} Jean-Pierre Duffas, MD,^{‡‡} Laurent Ferrier, PhD,* and Hélène Eutamène, PhD[†]

Background: In human pathology, the “creeping fat” (CF) of the mesentery is unique to Crohn's disease (CD). CF is usually referred to as an ectopic extension of mesenteric adipose tissue (MAT). However, since no animal model developing CF has ever been established, very little is known about this type of fat-depot expansion and its role in the development of the disease.

Methods: We developed and standardized an experimental protocol in mice that reproducibly induces CF development when a severe colonic inflammation is obtained by intracolonic instillation of DNBS.

Results: Macro-microscopic observations revealed a fatty appearance of CF. Yet when compared to MAT from the same animals, CF contains very little triglycerides, few adipocytes, and we observed a very low expression and protein levels of both adipose markers (hormone-sensitive lipase, perilipin) and adipocytokines (leptin, adiponectin). The decreased expression of perilipin in CF was also observed by immunohistochemistry. Conversely, the expression of proinflammatory and fibrous markers (Pref-1) was much higher in CF than in MAT. These observations were fully consistent with those made on CF recovered from five CD patients and compared with subcutaneous and mesenteric fat from the same patients.

Conclusions: Altogether, this work reports an original experi-

mental mice model of CF. In this model we establish for the first time that CF only occurs in severe colonic inflammation and shows an inflammatory, fibrous but not an adipose pattern.

(*Inflamm Bowel Dis* 2010;000:000–000)

Key Words: creeping fat, mesenteric adipose tissue, Crohn's disease, animal model

Ulcerative colitis and Crohn's disease (CD) are the most common forms of inflammatory bowel disease (IBD). The hallmarks of CD are chronicity and uncontrolled inflammation of intestinal mucosa which can affect any part of the gastrointestinal tract, but most commonly occurring in the distal ileum and/or colon. At the onset of disease, although patients show a weight loss,¹ a specific hypertrophy of mesenteric adipose tissue (MAT) has been evidenced.² In addition, an ectopic tissue surrounding the inflammatory and ulcerated areas has also been identified by Crohn et al³ in the first original description of the disease in 1932. This ectopic tissue is referred to as “creeping fat” (CF). In the literature, CF is described as a proliferation and an extension of the mesenteric adipose tissue. CF is encroached at the antimesenteric surface of the bowel and surgical description defined CF as more than 50% coverage of the intestinal surface.⁴ Moreover, surgeons are familiar with CF and use it as an anatomical marker to delineate the extent of active disease.⁵ CF is present in all CD patients undergoing ileal resection and correlates with the degree of inflammation.⁶ Although this CF is known since CD was first described, the pathophysiological relevance of this ectopic tissue remains unknown since most human studies do not distinguish between MAT and CF.

White adipose tissue (WAT) was first described as a passive tissue that stores energy as triglycerides (TG) after food intake and releases energy as free fatty acid during the fasting state. During the past 10 years this point of view has totally changed and the adipose tissue is described as a real endocrine organ. A wide variety of products such as adipocytokines, chemokines, leptin, and adiponectin are expressed and secreted by the adipose tissue. The description of MAT and CF make it interesting

Received for publication June 4, 2010; Accepted June 7, 2010.

From the *INRA, UMR 1054, Neuro-Gastroenterology & Nutrition Unit, Toulouse, France, [†]University of Toulouse, EI-Purpan, UMR 1054, Neuro-Gastroenterology & Nutrition Unit, Toulouse, France, [‡]INSERM, I2MR, Adipocyte secretions, Obesity and Associated Pathologies team, Toulouse, France, [§]INRA, UR66, Pharmacology Toxicology Unit, Toulouse, France, [¶]IFR150, INSERM U563, Toulouse, France, ^{||}INSERM U773, Center of Biomedical Research Bichat-Beaujon, CRB3, Paris, France, **INRA, UMR 1280, Physiology of Nutritional Adaptations, Nantes, France, ^{††}Department of Digestive Surgery, Purpan University Hospital, Toulouse, France, ^{‡‡}Department of Digestive Surgery, Rangueil University Hospital, Toulouse, France.

The last two authors contributed equally.

Reprints: Vassilia Théodorou, PhD, INRA, EI-Purpan, UMR1054, Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France (e-mail: vtheodorou@toulouse.inra.fr)

Supported by an institutional grant from the INRA. Isabelle Olivier is the recipient of joint fellowship from INRA and région Midi-Pyrénées.

Copyright © 2010 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.21413

Published online in Wiley OnlineLibrary (wileyonlinelibrary.com).

by its hypertrophy and its capacity to secrete pro- and anti-inflammatory products. These tissues have been studied in recent years and the pathophysiological roles of their secretions (e.g., leptin, adiponectin) remain under debate.^{7,8}

So far, no description of CF morphology, metabolism, and/or function is established in the literature. This lack of knowledge is due to the absence of an appropriate animal model allowing CF development, despite several animal models of chronic intestinal inflammation being extensively used, e.g., dextran sulfate sodium (DSS), trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) or dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS).⁹ The intrarectal (IR) administration of DNBS hapten reagent in ethanol solution causes disruption of the epithelial layer and exposes lamina propria to bacterial and host-haptened protein. The intestinal inflammation induced by DNBS has many characteristic features of CD in humans, including severe transmural inflammation associated with diarrhea, rectal prolapse, and weight loss. In spite of the common use of this animal model of colitis, development of CF was never described. Thus, the aim of the present study was, on the one hand, to define the conditions of colonic inflammation by IR administration of DNBS to set up a mice model of colitis allowing the development of CF. On the other hand, we describe MAT and characterize the CF obtained in these specific colonic inflammatory conditions. Finally, we validated the relevance of our model using human tissues.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Nine-week-old male Balb/c mice, weighing 23 ± 0.5 g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were used in this study. Mice had free access to water and food and were maintained in the pathogen-free animal facility at a constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12/12 hour light/dark cycle.

Human Samples

Five patients (35–45 years old) suffering from CD were included in this study. All patients provided written and informed consent to participate in this study. Tissues samples of CF, MAT, and subcutaneous adipose tissue were collected at both CHU Purpan and CHU Rangueil, Toulouse, France during ileocecal resection.

Induction of Colitis by DNBS

Colitis was induced by IR administration of DNBS (Fluka, Saint Quentin-Fallavier, France). A stock solution of DNBS was prepared by dissolving 65 mg of DNBS in 1 mL of 50% ethanol, 50% saline solution. Mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), instilled in the colon at 4 cm from the anus, using a

polyethylene catheter, with 100 μL of this solution. After the instillation, the mice were held upside down by their tails for 15 seconds and received 0.2 mL of saline (subcutaneously, s.c.) to prevent dehydration. Control mice were anesthetized and perfused with 100 μL of saline. The mice were sacrificed 3 days after the induction of colitis.

Mice Body Weight and Colon Length

The weight of mice was recorded the day of instillation and the day of sacrifice. The colon length was measured after the sacrifice.

Adipose Depot Dissection

Three days after DNBS instillation mice were sacrificed by exsanguination. Perigonadic adipose tissue, MAT, CF, and colon were dissected. MAT was defined as the adipose tissue surrounding the lymph nodes and around the cecum. CF identified as a tissue surrounding the ulcerative colonic area was gently removed. The samples were directly frozen at -80°C .

Macroscopic Damage Scores

Immediately after sacrifice the colon was removed and rinsed with saline. Intestinal damage was scored according to a modified scale of Wallace et al.¹⁰ Briefly, the presence of mucosal hyperemia and bowel wall thickening, the severity and extent of ulceration and necrosis, the tissue adhesion, and the occurrence of diarrhea were rated according to a macroscopic damage score (MDS) ranging from 0 (normal appearance) to 10 (severe lesions).

Myeloperoxidase Activity

The measurement of myeloperoxidase (MPO) activity, a marker of polymorphonuclear primary granules, was measured in the colon and in adipose tissue (MAT and CF), as described previously. The totality of tissue (colon or adipose tissue) was suspended in potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 44 mM, K_2HPO_4 6 mM, pH 6.0), homogenized on ice with Polytron (PCU-2, Kinematica, Lucerne, Switzerland) and submitted to three cycles of freezing and thawing. Homogenates were then centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at 4°C . The pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (0.5%; wt/vol; in potassium phosphate buffer) to release MPO from polymorphonuclear neutrophil primary granules. These suspensions were sonicated (Büchi, Flawil, Switzerland) on ice and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at 4°C . Supernatant fractions were diluted in potassium phosphate buffer containing 0.167 mg O-dianisidine dihydrochloride/mL and 0.00005% (vol/vol) H_2O_2 . MPO from human neutrophils (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France; 0.1 U/mL) was used as a standard. Changes in absorbance at 450 nm were recorded with a spectrophotometer every

10 seconds over 2 minutes. One unit of MPO activity was defined as the quantity of MPO degrading 1 μmol H_2O_2 $\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$ at 25°C. Protein concentrations (mg/mL) were determined using a modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, BioRad, Ivry/Seine, France) and MPO activity was expressed as MPO units/g protein.

Plasmatic Assays

Plasma from control animals and mice with MDS >4 were collected. Samples were then processed for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits to determine plasma levels of IL-6 and adiponectin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturers' protocols, and data are expressed as concentration per mL (IL-6) or μL (adiponectin) of plasma.

Histological Studies

The collected samples were fixed in formaldehyde 40% for 24 hours, embedded in paraffin blocks, and cut into 5 μm sections for histology analysis. Paraffin sections were stained with hemalun and eosin (H&E).

Immunohistochemistry

Colonic samples were fixed for 12 hours in 4% formalin, dehydrated through graded ethanol, and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were rehydrated and submerged in antigen retrieval solution (citrate buffer, 10 mM, pH 6, 95°C, 10 minutes). After inhibition of endogenous peroxidases with 3% H_2O_2 in Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween20 (TBST) for 10 minutes and incubation in blocking solution (TBST with 5% goat normal serum), sections were incubated with rabbit perilipin primary antibody (Ozyme, Saint-Quentin Yvelines, France) (1/100, overnight, 4°C) followed by a biotinylated goat antirabbit IgG immune serum (30 minutes, room temperature) and subsequently with ABC complexes coupled to peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, AbCys, Paris, France). Antigen-antibody complexes were revealed using 3-3' diaminobenzidine (DAB kit, Clinisciences, Montrouge, France) and sections were dehydrated and mounted. As negative controls, sections were treated with the same procedure except for the presence of primary antibody.

Digestion by Collagenase

MAT and CF were digested in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medium containing 1 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich) and 1% BSA (Euromedex) for 30–45 minutes at 37°C under shaking. The floating adipocytes were separated from the medium containing the stroma-vascular fraction (SVF).

Oil Red O Staining

Frozen sections of MAT and CF were fixed in ice-cold 10% formalin. The sections were briefly incubated in

propan-2-ol solution and in oil red O solution (0.2 g in 100 mL of propan-2-ol) for 20 minutes. The sections were rinsed with distilled water. Lipids were stained in red.

Lipid Profiling

TGs and fatty acids assay were performed as previously described.^{11,12} Briefly, following homogenization of tissue samples in methanol / 5 mM EGTA (2:1 v/v), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg of tissue were extracted according to Bligh and Dyer¹² in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v) in the presence of the internal standard: glyceryl triheptadecanoate. TGs were analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using a Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5 m \times 0.32 mm i.d., 0.50 mm film thickness). The oven temperature was programmed from 200–350°C at a rate of 5°C per minute and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were at 315°C and 345°C, respectively.

To measure total fatty acid methyl ester molecular species (FAME), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg of tissue were extracted in the presence of glyceryl triheptadecanoate (0.5 μg) as an internal standard. The lipid extract was transmethylated with 2 mL of BF₃ in methanol/hexane (1:1) for 60 minutes at 100°C and the FAMES were then extracted after addition of 2 mL of hexane and 1 mL of water. The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50 μL ethyl acetate. One μL of FAME was analyzed by gas-liquid chromatography on a 5890 Hewlett Packard system using a Famewax RESTEK fused silica capillary columns (30 m \times 0.32 mm i.d., 0.25 mm film thickness). The oven temperature was programmed from 110–220°C at a rate of 2°C per minute and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were at 225°C and 245°C, respectively.

mRNA Expression by Real-time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 500 ng were reverse-transcribed for 60 minutes at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamers. A minus reverse transcriptase reaction (without SSII) was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed with 25 ng of cDNA in a final volume of 20 μL using the SYBR Green TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fluorescence was monitored and analyzed in a GeneAmp 7500 detection system instrument (Applied Biosystems). Analysis of 18S ribosomal RNA was performed in parallel using the ribosomal RNA control TaqMan assay kit (Applied Biosystems) to normalize gene expression.

TABLE 1. Primers Used for Real-time RT-PCR Experiments

	Sense	Antisense
Mice		
Adiponectin	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT
Leptin	GGGCTTCACCCCATTCTGA	TGGCTATCTGCAGCACATTTTG
HSL	GGCTTACTGGGCACAGATACCT	CTGAAGGCTCTGAGTTGCTCAA
IL-6	GCCCACCAAGAACGATAGTCA	CAAGAAGGCAACTGGATGGAA
MCP-1	GCAGTTAACGCCCCACTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
F4/80	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
Human		
Adiponectin	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT
Leptin	GGGCTTCACCCCATTCTGA	TGGCTATCTGCAGCACATTTTG
HSL	GGCTTACTGGGCACAGATACCT	CTGAAGGCTCTGAGTTGCTCAA

Results are expressed as $2^{(Ct_{18S} - Ct_{gene})} [1 - (1/2^{(Ct_{gene} - Ct_{RT})})]$, $\times 100,000$, where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. All primers used (Table 1) were validated for PCR efficiency.

Protein Expression by ELISA

CF and MAT from mice with MDS >4 were collected. Samples were then processed for ELISA using commercial kits to determine levels of adiponectin and leptin (Invitrogen) according to the manufacturers' protocols and data are expressed as concentration per mg of protein.

Western Blot

Samples were homogenized on ice in an extraction buffer (24 mM Tris buffer, pH 7.4 containing 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Igepal, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, supplemented with protease inhibitor cocktail 1 mM; Roche).

For analysis, 20 μ g of protein was loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes (Whatman Biosystems, UK) at 80 V for 1 hour. Nonspecific binding sites were blocked for 1 hour at room temperature in 24 mM Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 and 5% milk. Membranes were then incubated with rabbit anti-perilipin 1/400 or rabbit anti-actin 1/1000 antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with fluorescent CF770 antirabbit 1/10,000 antibody (Biotium, Hayward, CA) with gentle rocking and protected from light. Finally, they were scanned on an infrared imaging system Odyssey (Li-Cor, Lincoln, NE).

Data Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) was used. Between-group comparison within groups was performed by Student's paired *t*-test. Multiple comparisons within groups were performed by repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Ethical Considerations

Animal care and work protocols were approved by the regional ethical committee of Midi-Pyrénées (Agreement #MP/02/46/11/08). For human studies, all subjects provided written and informed consent to participate.

RESULTS

Model of Colitis and Development of CF

To set up an animal model allowing CF development, a protocol was established based on the DNBS model. Male Balb/c mice weighing 23 g were intrarectally instilled with a catheter at 4 cm from the anus with 100 μ L of a highly concentrated solution of DNBS: 260 mg/kg diluted in 50% ethanol and sacrificed 3 days after instillation. Three days after instillation, during the peak of colonic inflammation, 20% mortality was observed and 40% of treated mice developed only a moderate inflammation, characterized by MDSs between 0 and 4. Moreover, 40% of mice developed a severe inflammation with MDS >4 (Fig. 1a) reflected by large colonic ulcerative and necrosis areas. CF development was specifically observed in all mice with MDS >4 , but not in animals with moderate colitis severity (MDS ≤ 4) (Fig. 1b). As observed in CD

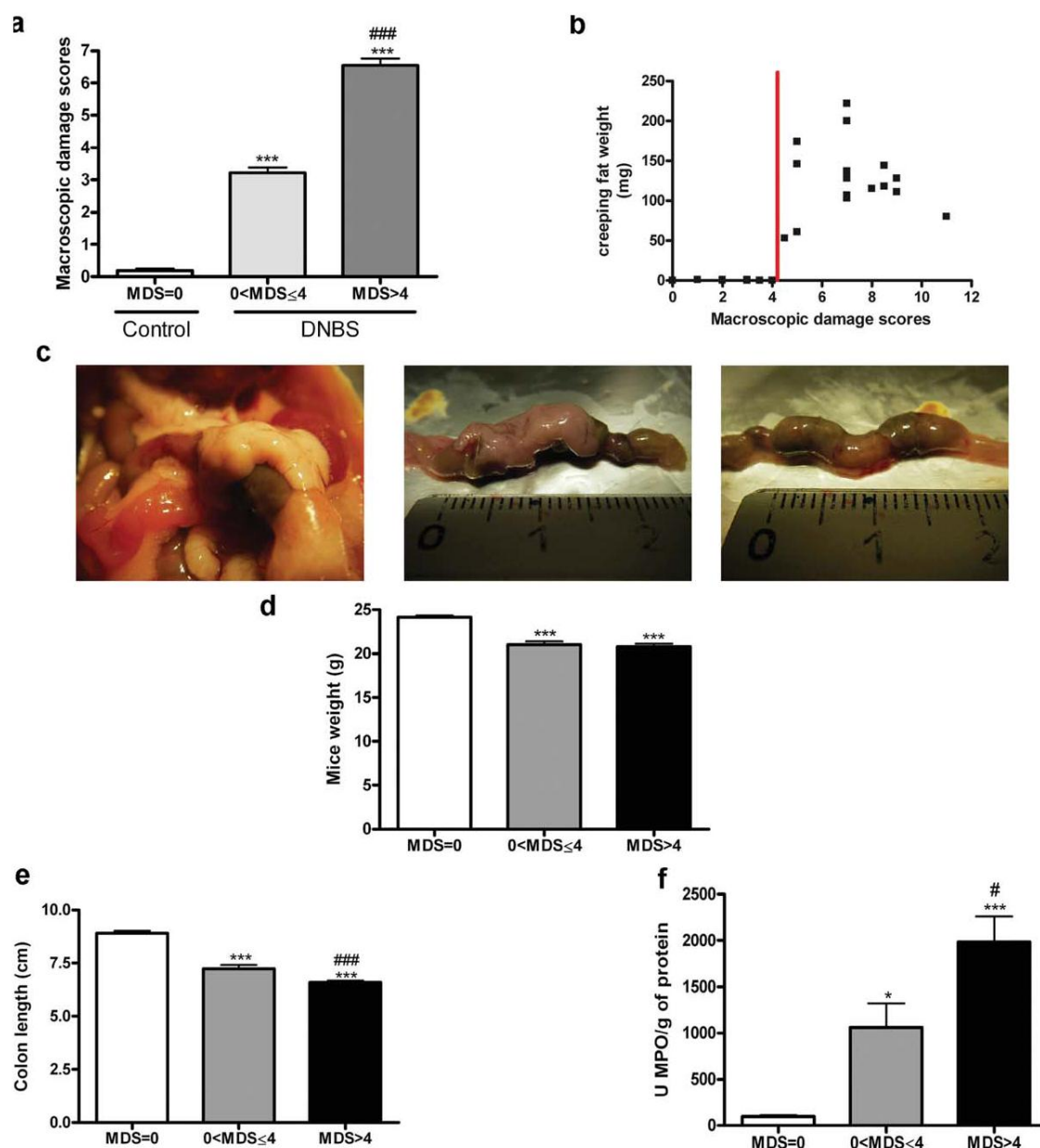


FIGURE 1. Creeping fat development according to severity of colitis and inflammation induced by DNBS. Mice were IR infused with 100 μ L of DNBS (50% ethanol) and sacrificed 3 days later. Evaluation of MDS was used to classify mice in three groups according to severity of colitis: controls mice (MDS = 0) and DNBS mice with MDS less or more than four (MDS \leq 4 and MDS > 4) (a). CF developed only in mice with MDS > 4 (b, red line defines MDS = 4). In inflamed mice, CF appeared a sleeve surrounding the ulcerated areas of colon (c). We evaluated the mice body weight (d), the length of colon (e), and we assayed colonic MPO activity (f). Data are expressed as means \pm SEM (n = 15), * P < 0.05, *** P < 0.001 versus MDS = 0 (control) and # P < 0.05, ### P < 0.001 versus 0 < MDS \leq 4 (moderate inflammation).

patients,⁵ CF appears as a sleeve surrounding the ulcerated areas of the inflamed colon in mice (Fig. 1c). Macroscopic observations revealed a compact and fatty appearance of this tissue as observed in CD (Fig. 1c). Interestingly, 7 days after DNBS instillation, a remission of colitis was assessed by low MDS (1–4), and was characterized by the

absence of CF (data not shown). DNBS-instilled mice also showed characteristic features of inflammation, such as a significant global body weight loss similarly described in CD¹ (Fig. 1d). Moreover, in mice with CF (MDS > 4), both a significant colon shortening and increase of colonic myeloperoxidase (MPO: a marker of neutrophil infiltration)

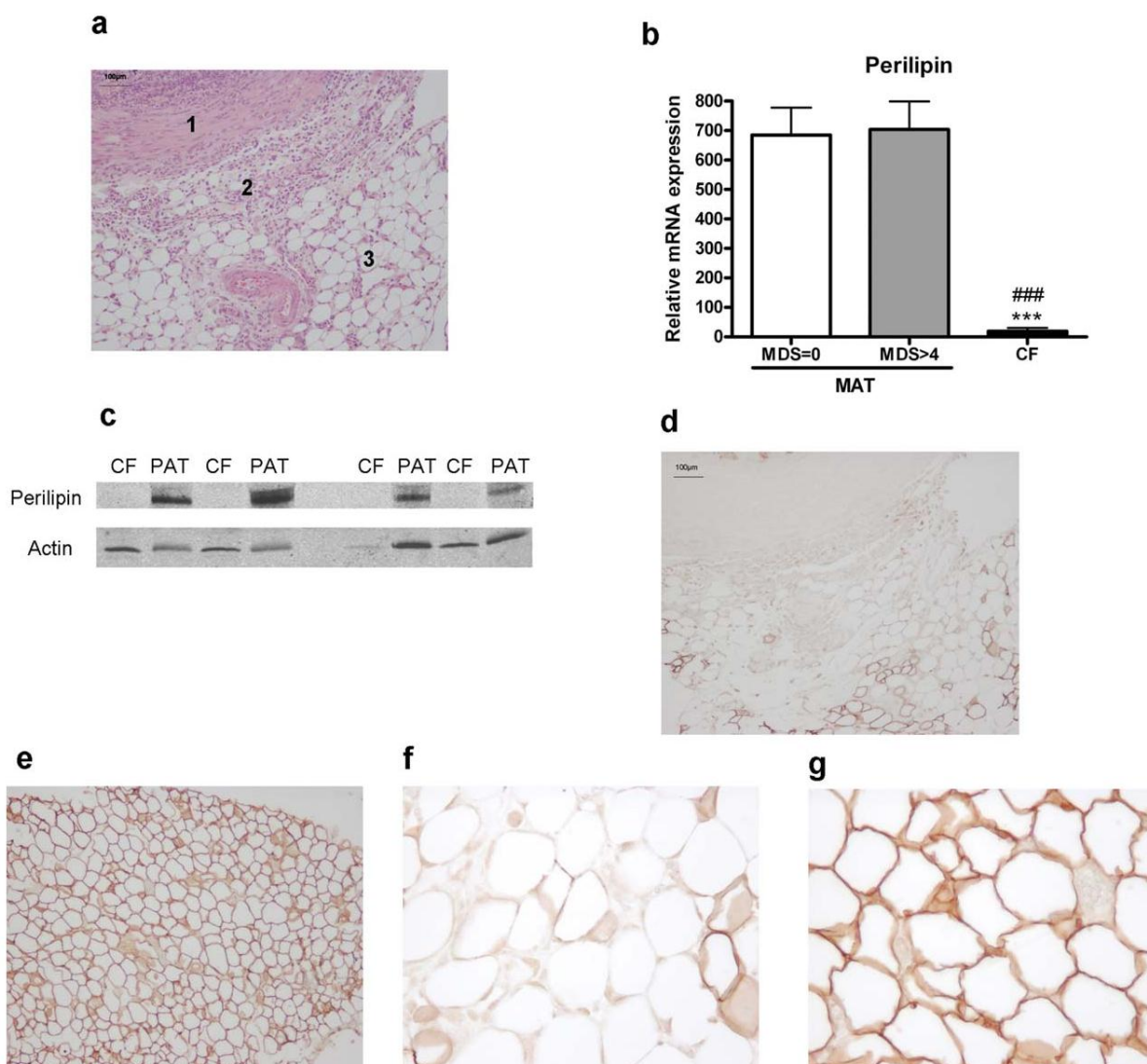


FIGURE 2. Study of perilipin in CF. H&E staining was performed on paraffin slices of CF ($\times 10$) and showed (1) fibroblastic area, (2) inflammatory area, and (3) adipose-like cells (a). Messenger RNA encoding perilipin (b) and HSL (e) were quantified by real-time RT-PCR in both MAT of mice with MDS = 0 and MDS >4 ($n = 5$) and in CF ($n = 8$). The perilipin protein expression in perigonadic adipose tissue (PAT) and CF was studied by Western blot ($n = 6$) (c). Immunohistochemistry for perilipin was performed ($\times 10$) in the same slices used in 2a (d) and in a perigonadic adipose tissue slide (e). A higher magnification ($\times 40$) of (d) and (e) were performed (respectively, f and g).

activity compared to either control mice and mice with MDS ≤ 4 were observed (Fig. 1e,f). Taken together, these data show that CF development was clearly correlated with the severity of colonic inflammation.

Is CF an Adipose Tissue?

H&E staining was performed in CF and revealed the presence of fibroblastic, inflammatory, and adipose-like cells (Fig. 2a). CF and MAT were digested by collagenase, allowing separation of two classical fractions: adipocytes and stroma vascular fraction (SVF). Adipocytes and SVF

were obtained after MAT digestion (data not shown). Surprisingly, no adipocyte was recovered after CF digestion. Similarly, no staining by red oil O (a specific lipid dye) was observed in CF (data not shown). Moreover, the expression of mRNA and protein of perilipin, a lipid droplet-coating protein, were undetectable in CF (Fig. 2b,c) in comparison to MAT (Fig. 2b) and to perigonadic adipose tissue (Fig. 2c). These data were reinforced by a drastic decrease or the absence of perilipin immunoreactivity in CF (Fig. 2d), compared with perigonadic adipose tissue (Fig. 2e). Moreover, a higher magnification of the

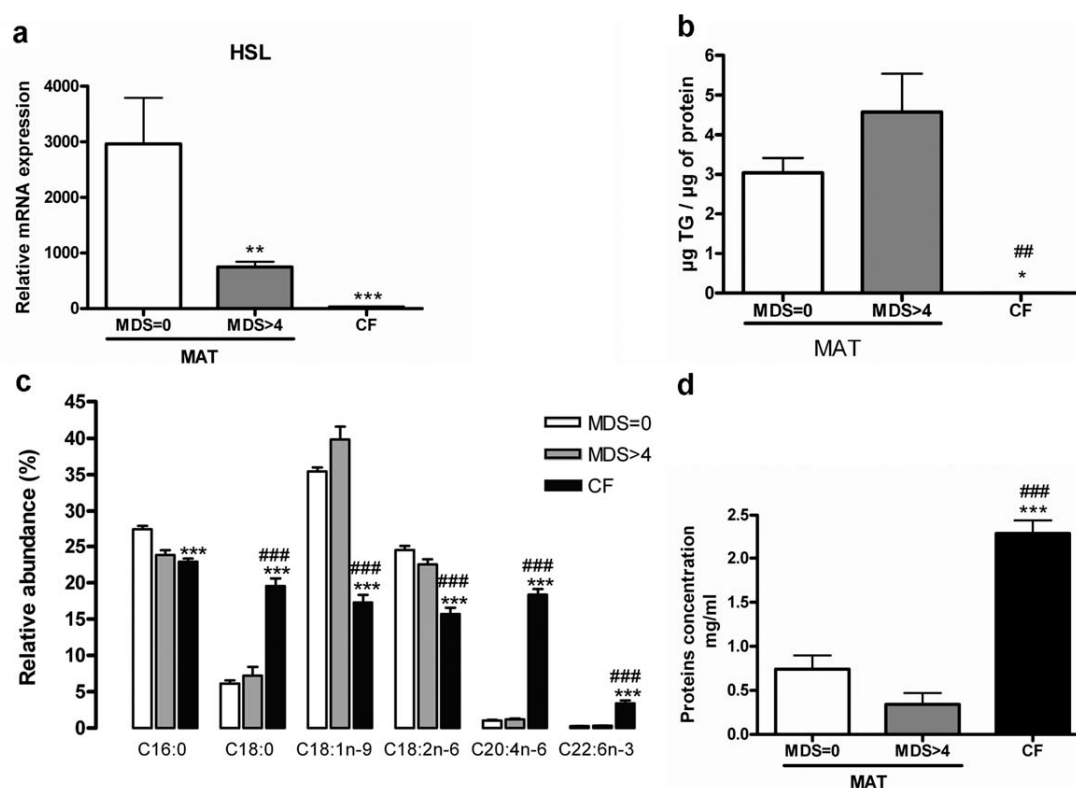


FIGURE 3. mRNA encoding HSL were quantified by real-time RT-PCR in both MAT of mice with MDS = 0 and MDS >4 ($n = 5$) and CF ($n = 8$) (a). Triglycerides were assayed in control mice and DNBS mice with MDS >4 ($n = 4$) (b). The nature of fatty acid that compose MAT ($n = 5$) and CF ($n = 4$) were studied (c). Protein assay was performed in MAT and CF ($n = 6$) (d). Data are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus MDS = 0 (control) and # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ versus MDS >4 (moderate inflammation).

“adipose-like cells” from CF (Fig. 2f) revealed that these cells have a smaller size compared with adipocytes from perigonadic adipose tissue (Fig. 2g). Messenger RNA encoding hormone-sensitive lipase (HSL), an enzyme involved in lipolysis, was almost undetectable in comparison to MAT (Fig. 3a). Similarly, triglyceride (TG) levels were very low in CF (Fig. 3b), showing that CF does not store energy as TG. Consistent with this observation, the fatty acid (FA) composition of CF was found to be clearly different from that of MAT. As shown in Figure 3c, CF contained a higher proportion of FA predominantly found in membrane phospholipids (C18:0, C20:4n-6, C22:6n-3) rather than in TG such as C18:1n-9 and C18:2n-6 (Fig. 3c). This observation could be related to the higher concentration of proteins found in CF compared to MAT (Fig. 3d). Both observations suggest a higher cellularity in CF.

In inflamed animals the expression of mRNA encoding leptin and adiponectin, two adipocytokines expressed by adipocytes, was significantly decreased in MAT and close to zero in CF (Fig. 4a,b). In the same way, the protein level of these two adipokines were significantly lower in MAT than in CF, in

mice with MDS >4 (Fig. 4c,d). Accordingly, plasma levels of adiponectin were decreased in DNBS-treated mice (Fig. 4e). MAT of both control and DNBS mice showed the same pattern of Pref-1 (preadipocyte factor-1) expression (Fig. 4f). By contrast, Pref-1 expression was markedly higher in CF (Fig. 4f), suggesting that CF cells include preadipocytes and/or fibroblasts but not mature adipocytes.

CF: An Inflammatory Tissue

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) plays an important role in the recruitment of monocytes at sites of injury. Interestingly, we found MCP-1 expression significantly higher in inflammatory than in control conditions (Fig. 5a), both in MAT and CF. Moreover, MPO activity was significantly increased in MAT from CF-developing mice (MDS >4) in comparison with MAT from control mice. Further, the strongest MPO activity was observed in CF (Fig. 5b). In our model, as expected, the expression of mRNA encoding IL-6 in MAT and CF was higher under inflammatory than control conditions (Fig. 5c). In addition, plasma levels of IL-6 were also increased in DNBS-treated

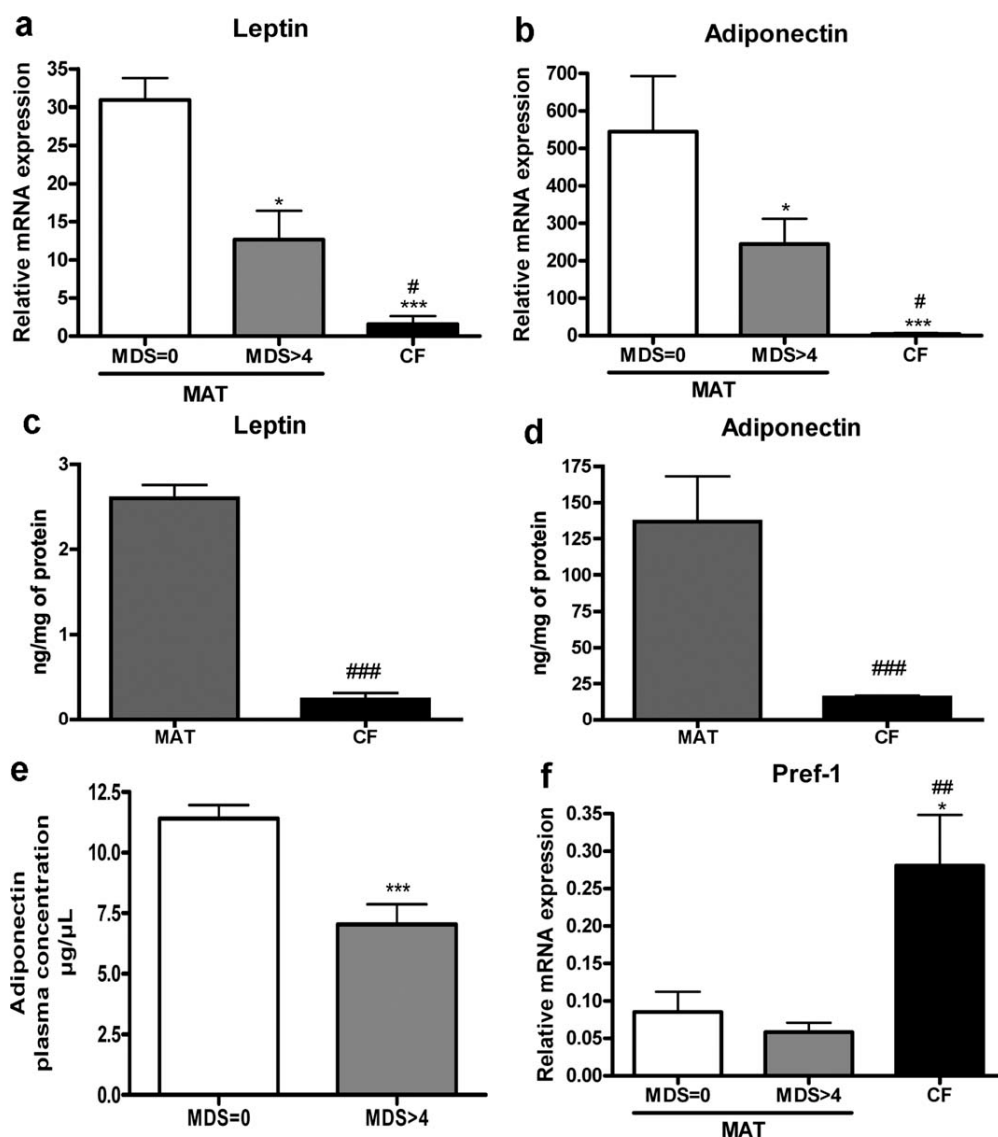


FIGURE 4. Expression of adipocytokines. mRNA encoding leptin (a), adiponectin (b), and Pref-1 (f) were quantified by real-time RT-PCR in both MAT of mice with MDS = 0 and MDS >4 ($n = 5$) and CF ($n = 8$). The protein level of leptin (c) and adiponectin (d), were quantified by ELISA in both MAT ($n = 5$) and CF ($n = 8$) of mice with MDS >4. The plasmatic levels of adiponectin (e) was evaluated by ELISA in MDS = 0 and MDS >4 mice. Data are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus MDS = 0 (control) and # $P < 0.05$ versus MDS >4 (moderate inflammation).

mice (Fig. 5d). Finally, the expression of F4/80, a widely used marker of tissue macrophages in mice, was significantly increased in CF compared to MAT of both control and inflamed mice (Fig. 5e).

Human CF

Metabolic marker (HSL) and adipokine (leptin, adiponectin) expression were analyzed in human CF, MAT, and subcutaneous adipose tissue (SC) recovered from five CD patients. As expected, a depot-specific expression of adiponectin and leptin was observed, according to the tis-

sue sample origin. Leptin expression was higher in SC in comparison to MAT.¹³ On the contrary, mRNA encoding adiponectin was strongly expressed in MAT compared with SC (Fig. 6). The level of all markers was weak in CF compared to MAT from CD patients (Fig. 6). Thus, the expression profile of these markers in human CF was similar to murine CF.

DISCUSSION

Although CF has long been recognized in CD patients,³ our current knowledge of the nature and roles of

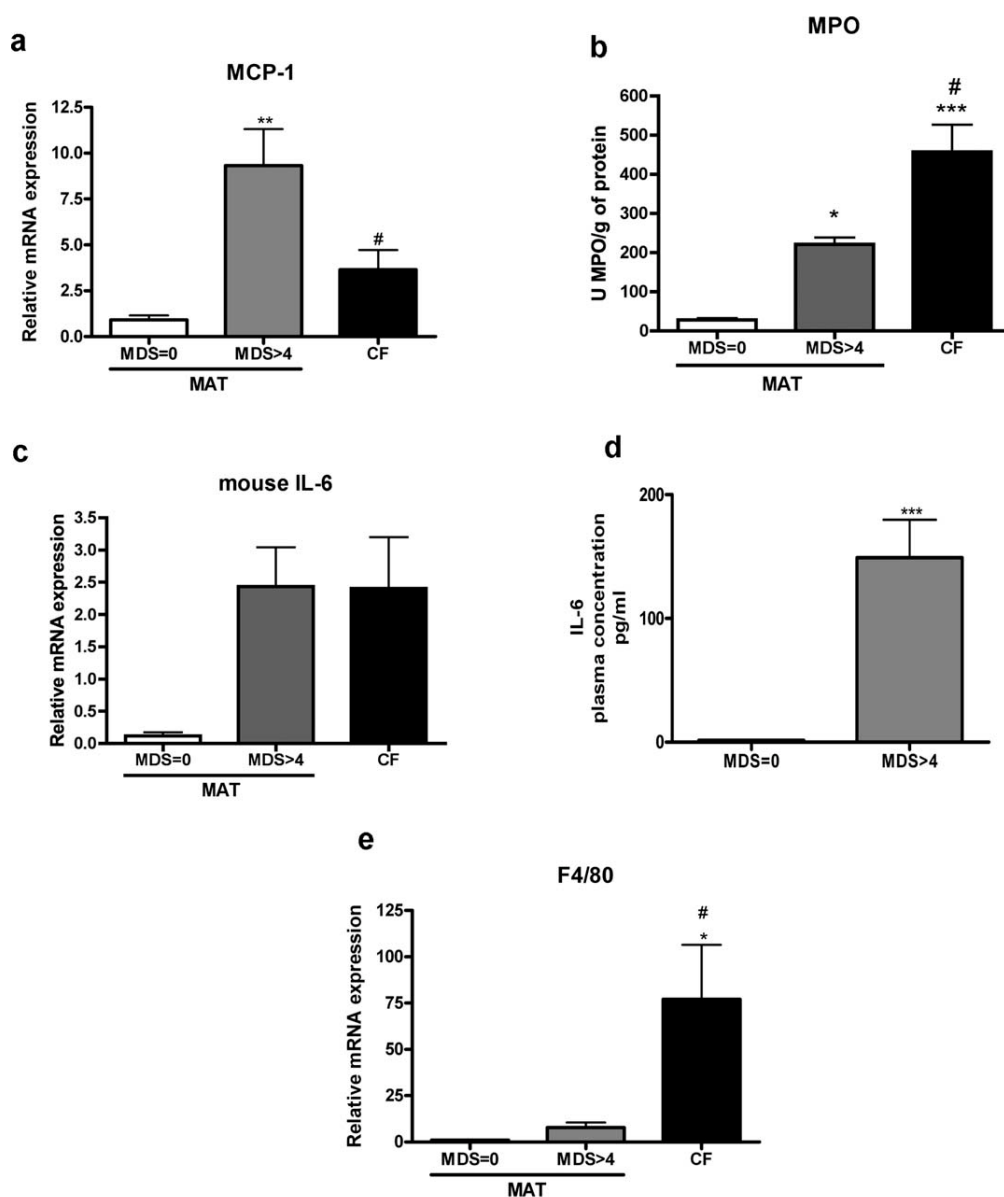


FIGURE 5. Study of inflammatory pattern. mRNA encoding MCP-1 (a), IL-6 (c), and F4/80 (e) were quantified by real-time PCR in both MAT of mice with MDS = 0 and MDS >4 ($n = 5$) and CF ($n = 8$). MPO activity was assayed in MAT of mice with MDS = 0 and MDS >4 and in CF ($n = 10$) (b). The plasmatic level of IL-6 (d) was evaluated by ELISA in MDS = 0 and MDS >4 mice. Data are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus MDS = 0 (control) and # $P < 0.05$ versus MDS >4 (moderate inflammation).

this ectopic tissue surrounding the necrotic areas is limited. We have standardized a protocol of DNBS-induced colonic inflammation to set up an animal model allowing CF development. We report that CF development is clearly correlated with the severity of colitis illustrated by elevated colonic MDS, MPO, and a loss in body weight in mice. Indeed, only mice with a severe inflammation (MDS >4) including large necrosis areas developed CF. In our experiments, this specific CF development was allowed by using

a unique combination of parameters, never mentioned in the literature, regarding DNBS concentration (260 mg/kg in 50% EtOH), mouse sex (male), strain (Balb/c), age (9 weeks), and weight (23 g), allowing for the first time a model of mice CF to be described and studied. In humans, CF is commonly considered an extension of MAT.⁴ As far as we know, no study has characterized CF as a functional or metabolic active adipose tissue. While WAT is known as a tissue that stores energy in adipocytes as triglycerides

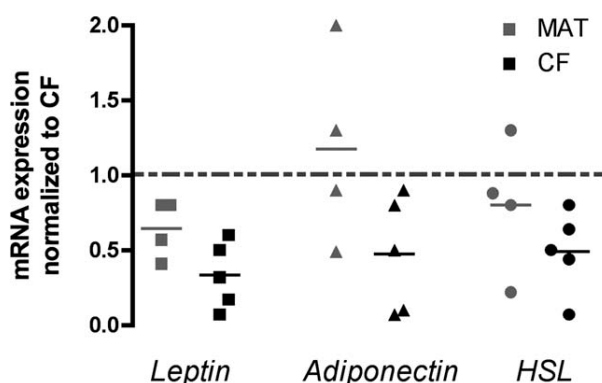


FIGURE 6. Study on human tissues. The expression of mRNA encoding leptin, adiponectin, and HSL in CF ($n = 5$) versus MAT ($n = 4$) and subcutaneous adipose tissue ($n = 5$) were quantified in human samples by real-time RT-PCR. Expression levels in CF were normalized to the ones in subcutaneous adipose tissue, represented by the gray line.

(lipogenesis), and releases energy as free fatty acids (lipolysis), our results show that in mice, CF is characterized by the absence of adipocytes, no TG storage, and no lipolytic activity. We also showed that the expression of Pref-1 is enhanced in CF. Pref-1 is described as undetectable in mature adipose cells, and used as a marker of preadipocytes,¹⁴ i.e., fibroblastic-like cells. Thus, CF cells might include preadipocytes and/or fibroblasts but not mature adipocytes. Consequently, CF cannot be described as a typical adipose tissue in our model.

In our model, a modification of MAT was also observed. Indeed, MAT from DNBS mice displays a loss of the adipose profile, assessed by a decrease of leptin, adiponectin, and HSL in comparison with MAT from control mice. These data are consistent with studies of Mattacks et al,¹⁵ which described a decrease of lipid markers in MAT in a model of TNBS-induced colitis. Moreover, the increase of inflammatory markers (IL-6, MCP-1, MPO) in MAT from DNBS mice, in comparison with MAT from control mice, allows defining this adipose tissue as an inflammatory tissue. These results are consistent with the literature. Indeed, as referred to by Karagiannidis et al¹⁶ in a close model of TNBS-induced colitis in rat, the induction of colitis causes an inflammatory response in MAT illustrated by an increase of IL-6 and MCP-1 in this adipose tissue.

Concerning CF, we have demonstrated that both mRNA expression and the protein level of adiponectin are lower in CF compared to MAT, in line with decreased plasma levels. These data are in accordance with studies performed in CD patients,¹⁷ while in mice, the pro- or anti-inflammatory role of adiponectin remains controversial.^{18,19} In vitro, IL-6 has been shown to inhibit adiponectin expression and secretion.²⁰ In our mice model, the expression of IL-6 in CF, and plasma level of IL-6, are increased. This suggests

that the decreased adiponectin expression observed in our model may be a consequence of high IL-6 levels, giving CF a proinflammatory profile. In the same line, CF can be described as an inflammatory tissue infiltrated by neutrophils and macrophages. It is noteworthy that macrophages can present either tissue-destructive or repair activities.²¹ In the model of muscle damage, for instance, massive macrophage infiltration is observed at the site of injury and is involved in the muscle-healing processes.²² In the first step, necrosis of myocyte recruits proinflammatory macrophages (namely "M1") at the site of injury. These cells induce growth and proliferation of muscle cells. In the second step, M1 cells switch toward antiinflammatory macrophages ("M2") and lead to myogenic differentiation and myofiber growth.²² In our model, severe colitis induced by DNBS instillation can lead to a break of the colonic wall. Therefore, CF may play a double positive role: first a protective one against colonic perforation via a sleeve formation around the ulcerative colonic segment, preventing gut content leakage and possible endotoxemia; and second a role in colonic wall healing via numerous macrophages present in CF.

To establish the relevance of our mouse model, we analyzed metabolic marker (HSL) and adipokine (leptin and adiponectin) expression in MAT, CF, and subcutaneous adipose tissue (SC) human samples. We showed a weak expression of leptin, adiponectin, and HSL in CF compared with MAT. It is noteworthy that an increase of leptin and adiponectin in MAT from CD patients has been reported,^{8,23} but in these studies MAT from diverticulitis or colon cancer patients was considered controls, while we used both MAT and SC adipose tissues recovered from the same patient as controls. Thus, CF recovered either from experimental colitis in mice or CD in humans appears to share the same expression pattern regarding the markers examined.

In conclusion, we established a description of CF as an inflammatory tissue, and for the first time not as an adipose tissue. Indeed, CF does express inflammatory markers (IL-6, MCP-1, F4/80) but not typical adipose tissue markers (perilipin, HSL, leptin, adiponectin) and does not store triglycerides. The setup of a novel animal model of colitis leading to CF development is another original contribution of this work. Besides the scientific novelty, these data offer the possibility to study and understand the role, function, and involvement of CF in CD pathophysiology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sandra Grés, Estelle Wanecq, and Mathilde Levêque for technical assistance.

REFERENCES

- Shamir R. Nutritional aspects in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:S86–S88.

2. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117:73–81.
3. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc*. 1932;99:1323–1329.
4. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, et al. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg*. 1992;79:955–958.
5. Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research? *Gut*. 2005;54:742–744.
6. Borley NR, Mortensen NJ, Jewell DP, et al. The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link. *J Pathol*. 2000;190:196–202.
7. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, et al. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:100–105.
8. Barbier M, Vidal H, Desreumaux P, et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol*. 2003;27:987–991.
9. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2:541–546.
10. Wallace JL, Keenan CM, Cucala M, et al. Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*. 1992;102:1176–1185.
11. Rebouissou S, Imbeaud S, Balabaud C, et al. HNF1 α inactivation promotes lipogenesis in human hepatocellular adenoma independently of SREBP-1 and carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) activation. *J Biol Chem*. 2007;282:14437–14446.
12. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911–917.
13. Amer P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:72–75.
14. Sul HS, Smas C, Mei B, et al. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(suppl 4):S15–19.
15. Mattacks CA, Sadler D, Pond CM. The cellular structure and lipid/protein composition of adipose tissue surrounding chronically stimulated lymph nodes in rats. *J Anat*. 2003;202:551–561.
16. Karagiannides I, Kokkotou E, Tansky M, et al. Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:5207–5212.
17. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, et al. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2009;25:172–181.
18. Fayad R, Pini M, Sennello JA, et al. Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation. *Gastroenterology*. 2007;132:601–614.
19. Nishihara T, Matsuda M, Araki H, et al. Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology*. 2006;131:853–861.
20. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301:1045–1050.
21. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76:509–513.
22. Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057–1069.
23. Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, et al. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut*. 2005;54:789–796.

RESULTAT 3 :

EFFETS OPPOSES DES SECRETIONS DU CREEPING-FAT SUR LA BARRIERE INTESTINALE EN CONDITIONS NON-INFLAMMATOIRES ET INFLAMMATOIRES

(Article en préparation)

Introduction et but de l'étude : La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin d'étiologie multifactorielle. Un des facteurs pathogéniques de cette maladie est l'altération de la barrière intestinale. Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent une augmentation de la perméabilité intestinale, prédictive d'un risque de rechute. Cette perméabilité est régulée par les complexes de protéines de jonctions mis en place entre les entérocytes. Dans les biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn, l'expression des protéines composant ces complexes est modifiée en comparaison à des sujets sains. De plus la MC entraîne l'ulcération et la nécrose de l'épithélium digestif. La rémission de cette pathologie nécessite, entre autre, une restauration des altérations épithéliales qui fait appel à la capacité réparatrice de l'épithélium via des mécanismes de différenciation, prolifération et de migration cellulaire. Le but de cette étude est d'évaluer l'implication du creeping-fat (CF), et plus particulièrement de ses sécrétions sur la fonction de la barrière intestinale en cas de colite.

Principaux résultats : Les sécrétions du creeping-fat et du tissu adipeux périgonadique (TAP), utilisé comme tissu contrôle, sont retrouvées dans les milieux conditionnés de ces tissus ; respectivement MC_{CF} et MC_{TAP}. L'incidence de l'exposition du côté séreux des milieux conditionnés a été testé sur la perméabilité paracellulaire intestinale (PPI) de segments coliques non-inflammatoires (NI) ou microinflammatoires (MI) issus de souris ayant subi une micro-inflammation au DNBS et montés en chambre de Ussing. Comme attendue, la PPI des zones MI est supérieure à celle observée au niveau des zones NI. L'exposition des segments coliques NI aux MC_{CF} du côté séreux entraîne une forte augmentation de la PPI de ces segments. De manière surprenante, l'exposition des segments coliques MI aux MC_{CF} ne modifie pas la PPI de ces derniers. Dans le même sens, l'exposition de cellules coliques T84 au MC_{CF} en condition basale entraîne une diminution du taux protéique d'occludine dans ces cellules. A l'inverse, la diminution de l'expression de

l'occludine, induite par une exposition des cellules à deux cytokines proinflammatoires que sont le TNF α et l'IFN γ , n'est pas exacerbée par l'ajout MC_{CF}. Aucun effet des MCTAP sur l'ensemble de ces paramètres n'a été observé. Nos études *in vitro*, ont également montré que les MC_{CF} provoquent une augmentation de la prolifération, de la migration et de la capacité de réparation des cellules coliques T84 en culture.

Conclusion :

Alors qu'en condition non-inflammatoire, les sécrétions provoquent une augmentation de la perméabilité para-cellulaire intestinale et une diminution de l'expression de l'occludine ; en conditions inflammatoires, les sécrétions du CF ne modifient ces paramètres. Le CF, ou plus particulièrement ses sécrétions semblent jouer un rôle différent suivant le statut inflammatoire des tissus. Il jouerait un rôle délétère dans la mise en place de l'inflammation des zones non-inflammatoires et/ou un rôle bénéfique en participant au mécanisme de réparation tissulaire nécessaire pour une rémission de la pathologie.

A l'heure actuelle, des études sont en cours au laboratoire afin d'identifier un facteur potentiel impliqué dans l'effet des milieux conditionnés de « CF-like ». Comme argumenté dans la discussion générale de cette thèse, deux pistes sont envisagées ; l'implication de l'IL-6 et de son récepteur soluble ainsi que l'implication de la β 2 défensine.

Opposite effects of creeping fat secretions on non-inflamed and inflamed intestinal barrier.

I. OLIVIER¹, M. Levêque¹, V. Bézirard, B.Sovran¹, V. Théodorou¹, H. Eutamene*¹, L.Ferrier*¹

¹ INRA, UMR 1331, Toxalim, Team “Neuro-Gastroenterology & Nutrition”, Toulouse, France.

* these authors contributed equally

Address for correspondence

Dr Laurent Ferrier

UMR 1331, Toxalim,

Neuro-Gastroenterology and Nutrition Team

180 chemin de Tournefeuille

BP 93173

31027 Toulouse Cedex 3

Phone : +33 561285140

Fax : +33 561285145

E-mail : lferrier@toulouse.inra.fr

ABSTRACT

Background and aims: Patients with Crohns disease (CD) develop a creeping adipose tissue surrounding inflammatory and ulcerated intestinal areas, namely creeping fat (CF). An impairment of intestinal barrier function has been described in CD patients linked to disease relapse. However the influence of CF in the epithelial barrier integrity remains unknown. Our aims were to evaluate the effect of CF secretions on colonic paracellular permeability, occludin expression, intestinal cell migration and wound healing in vitro, in basal and mild inflammatory conditions.

Methods: Three days after intracolonic administration of dinitro-benzene sulphonic (DNBS) acid (260mg/kg, 50%EtOH), male balb/c mice developed CF. CF and perigonadic adipose tissue (PAT: control tissue) were removed and incubated 4 hours at 37°C in 1.7 mL of HBSS to obtain conditioned medium (CM) of CF (CM_{CF-like}) and PAT (CM_{PAT}). The effect of CM on colonic paracellular permeability (CPP) to FITC-dextran 4kDa (FD4) was evaluated in Ussing chambers on colonic segments, harvested from control mice or mice submitted to a mild colitis by low concentration of DNBS (20mg/kg, limiting epithelial damage), and exposed to CM for 1 h. T84 cells ($8 \cdot 10^4$ or $5 \cdot 10^5$ cells/well in 96 or 24 well-plates, respectively) were incubated with CM over 48h to evaluate occludin expression (in-cell western blotting), cell proliferation (MTS incorporation), migration (Oris cell migration assay) and wound healing. Occludin expression was determined in cells cultured with or without IFN γ (10 ng/mL) and TNFa (5 ng/mL), to evoke inflammatory condition, and normalized to that of β -actin.

Results: Increased CPP was observed in colon from mice submitted to mild colitis when compared with healthy colonic segments (1.92 ± 0.20 vs 1.34 ± 0.25 nmol.h⁻¹.cm⁻² of FD4, $p < 0.05$). In healthy colonic segments, CM_{CF-like} strongly increased CPP (3.47 ± 0.54 vs 1.34 ± 0.25 nmol.h⁻¹.cm⁻² of FD4, $p < 0.01$), whereas CM_{PAT} had no effect. In contrast, exposure

to CM_{CF-like} of colonic segments from mice submitted to mild colitis did not exacerbate the increased CPP previously observed in these mildly inflamed tissues (1.8 ± 0.26 vs 1.92 ± 0.2 nmol.h⁻¹.cm⁻² of FD4). Accordingly, the expression of occludin in T84 cells was decreased in presence of IFN γ /TNF α (26.6 ± 1.4 vs 16.3 ± 1.1 , $p < 0.05$), and this effect was not exacerbated by CM_{CF-like}. T84 treatment with CM_{CF-like} increased their ability to proliferate (113% of controls), migrate (182.8% of controls) and improved wound healing (206.2% of controls) in comparison with T84 cells exposed to CM_{PAT} ($p < 0.05$) or control medium ($p < 0.01$).

Conclusion: CF secretions do not exacerbate the primary increase of colonic permeability observed in mild inflammatory tissue, nor worsen occludin down-expression. Moreover, CF secretions lead to an increased intestinal cell proliferation and migration promoting intestinal epithelial barrier healing.

Keywords: Inflammatory bowel disease; paracellular colonic permeability; occludin; wound-healing

INTRODUCTION

The current paradigm of the pathogenesis of Crohn's disease (CD) relies on an interaction between environmental and immune factors in genetically predisposed subjects. Dysfunctional intestinal barrier is a feature of gut inflammation in humans[390] and has been involved as a pathogenic factor in IBD for the last 30 years[391, 392]. Indeed, an increased intestinal permeability[393, 394] is currently described in CD patients and associated with a greater risk of a subsequent disease relapse[186, 187]. The intracellular spaces between adjacent cells, linked together by junctional complexes, play a pivotal role in regulating the intestinal permeability. Tight junctions are composed in part of transmembrane proteins such as occludin, claudins, and junctional adhesion molecule (JAM). In active CD patients a down-regulation of claudin 5 and 8, and occludin has been demonstrated in inflamed segments[188, 190]. The erosion, necrosis and apoptosis of intestinal cells induced by inflammatory process also contribute to the increase of intestinal permeability. Yet, whether the dysfunction of intestinal barrier is a consequence of the action of inflammatory mediators or a contributor of inflammation remains under debate. In one hand, pro-inflammatory cytokines as IFN γ and TNF α [218, 395, 396] lead to an increase of intestinal permeability. In the other hand, an increased bacterial translocation in CD patients[397, 398], due to a leaky intestinal barrier leads to enhance humoral immune response[399]. Complete remission of the disease requires both the disappearance of inflammation and the repair of the damaged epithelium. Mucosal healing (MH) is an important treatment goal in various gastrointestinal disorders such as peptic ulcer and other chronic diseases like CD. The introduction of the biologic infliximab® (an anti TNF α)²¹, [400, 401] therapy promotes gut mucosal healing (MH) in a substantial number of CD patients. The repair of the damaged intestinal epithelium is firstly initiated by the phenomenon called "restitution" following by the "regeneration" stage of the tissue.

Restitution is the most rapid response after injury, restoring the continuity of the epithelial layer by a redistribution of epithelial cells. This process is completed by the spread and migration of the local epithelial cells along the underlying matrix, which does not require epithelial cell proliferation[402]. Since epithelial integrity is critically linked to the prevention and healing of CD, the investigation of wound closure modifying factors has attracted a lot of attentions[403]. Growth factors[404], trefoil factors[402], cell adhesion molecules[405] and cytokines (IL-2[406], IL-1 β [407, 408]) are among the best studied mediators involved in the epithelial restitution.

In the first original description of Crohn's disease in 1932 an ectopic tissue surrounding the inflammatory and ulcerated areas was described[409]. This ectopic tissue is referred to as "creeping fat" (CF). CF is encroached at the anti-mesenteric surface of the bowel, and surgical description defined CF as more than 50% coverage of the intestinal surface [354]. Moreover, surgeons are familiar with CF and use it as an anatomical marker to delineate the extent of the active disease [410]. CF is present in all CD patients undergoing ileal resection and correlates with the degree of inflammation [356]. In a recent study, we designed an animal model allowing "CF-like" development[382]. We described this "CF-like" as an inflammatory tissue composed of numerous macrophages and neutrophils, and expressing pro-inflammatory markers like interleukin-6, Monocyte Chemoattractant protein-1[382]. Moreover in this model, as in humans[356], CF development is clearly localized around ulcerative inflamed tissue and colocalized with non-inflamed segments of the intestine. Although CF has been described for long years, the pathophysiological role of this ectopic tissue remains unknown. Therefore, the aims of our study were to evaluate, in both non-inflamed and mildly inflamed segments of the colon collected from mice previously exposed to DNBS, the effect of "CF-like" secretions on colonic paracellular permeability. The effects

of “CF-like” secretions on occludin expression, intestinal cell proliferation, migration and wound healing on T84 cells were also evaluated in this study.

MATERIELS AND METHODS:

1- Animals studies

Nine weeks-old male balb/c (weighting $23\pm 0.5\text{g}$) were used in this study. Mice had free access to water and food and were maintained in the pathogen-free animal facility at a constant temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$) on a 12/12 h light/dark cycle. Animal care and work protocols were approved by the regional ethical committee of Midi-Pyrénées (Agreement #MP/01/45/11/08).

Experimental design

In a first group, mice were intracolonicallly (IC) instilled by DNBS (260mg/kg and 50% EtOH) to obtain a severe colitis allowing CF-like tissue development[411]. In a second group, mice were IC instilled by DNBS (20mg/kg and 50% EtOH) in order to obtain in these animals a mild colonic inflammation and two distinct colonic segments i.e a mildly and non-inflamed colonic segments. A third group of mice was used as a control group.

The first group of mice were sacrificed 3 days after DNBS IC administration; then “CF-like” and the perigonadic adipose tissue (PAT) were removed and incubated 4 hours at 37°C in 1.7 mL of HBSS to obtain conditioned medium (CM) of CF ($\text{CM}_{\text{CF-like}}$) and PAT (CM_{PAT}). The CMs were used for Ussing chambers and cell culture experiments.

Mildly inflamed and non inflamed colonic segments from the second group of mice and colonic segments were collected 3 days after DNBS IC administration. These different colonic segments were used for Ussing chambers colonic paracellular permeability studies in presence or not of CMs.

Cytokine level in conditioned medium:

Samples of CM_{PAT} and CM_{CF-like} were processed for ELISA using commercial kits to determine levels of IL-6, MCP-1 and IL-1 β (Invitrogen) according to the manufacturers' protocols. Data are expressed as concentration per mg of protein.

2- Ussing chamber experiments

Immediately after sacrifice, distal colon was removed and cut along the mesenteric border, and two colonic strips from each mouse were mounted in Ussing chambers (Physiologic Instrument, San Diego, CA) with an exposed area of 0.3 cm². Both sides of each colonic segment were bathed in 5mL of circulating oxygenated Krebs–Henseleit solution (Sigma, S^t Quentin Fallavier, France), and maintained at 37°C. Colonic paracellular permeability was assessed by measuring mucosal-to-serosal flux of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled 4 kDa dextran (Sigma) across the colonic strip. Briefly, after a 20 min equilibrium period, 500 μ l of buffer solution on the mucosal side was replaced by 500 μ l solution of FITC-dextran (2.2 mg/mL as final concentration). At the serosal side of the colonic segment, 500 μ L of buffer solution was also removed and replaced by 500 μ L of CM_{PAT} or CM_{CF-like}. After 1 h, fluorescence was measured in the serosal compartment with a fluorimeter (Infinite M200, Tecan, Lyon, France). Results were expressed as the amount of FITC-dextran crossing 1 cm² of epithelium per hour (nmol.h⁻¹.cm⁻²).

3-Cells culture

T84 intestinal epithelial cells (Health Protection Agency cultures collection) were cultured in a 1:1 mixture of DMEM and Ham's F-12 medium supplemented with 10% of foetal calf serum (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France).

Western on-cell: T84 cells ($4 \cdot 10^4$ /well) were plated in a 96-well black with clear flat bottom microplate during 24 h at 37°C in a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), BSA 1%, Hepes 10mM medium. Medium was then changed for a HBSS-BSA-Hepes medium supplemented with Interferon γ (IFN γ) 10 ng/mL (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 12 h. Medium was changed again for the same medium supplemented with IFN γ 10 ng/mL and Tumor Necrosis Factor α (TNF α) 10 ng/mL (Sigma-St Quentin Fallavier, France). Conditioned media from creeping fat (CM_{CF-like}) were then added for 12h.

Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with methanol for 10 min at -20°C. After 2 washes, cells were permeabilized using PBS-triton 0.1% for 10 min at room temperature, then washed again and blocked with Odyssey blocking buffer (Rockland, Tebu-bio, France) for 1h at room temperature. Cells were incubated with rabbit occludin antibody 1/500 (Invitrogen) overnight at 4°C or goat anti-actin antibody 1/500 (Abcam, Cambridge, UK) for 1h at room temperature. After washing, cells were incubated with fluorescent CF770 anti rabbit or fluorescent CF680 anti-goat secondary antibodies 1/10000 (Biotium, Hayward, CA) with gentle rocking and protected from light. Finally, microplate was scanned on infrared imaging system Odyssey (Li-Cor, Lincoln, NE). The background fluorescence of secondary antibodies alone was subtracted from the signal intensities of the respective samples incubated with both primary and secondary antibodies. Actin was used as a reference protein to normalize calculations.

Proliferation: Cells were seeded at $4 \cdot 10^4$ /well into a 96 wells plate for 24 hours in a complete medium. Then cells were washed and conditioned medium of CF-like or PAT (1:10) were added in HBSS/BSA/Hepes for 24 hours. The proliferation was evaluated by using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France). Luminescence was recorded (Tecan), with an integration time of 500 ms. Results are

expressed in percentage of proliferation, by comparison to the control (medium without CM).

Migration: The Oris™ system (Platypus Technologies, LLC, Madison, WI) was used. Briefly, we used Oris™ cell seeding stoppers made from silicone to create an initial, 2mm diameter detection zone in the center of the well. T84 cells were dispensed into each well of a 96 wells micoplate at a density of $8 \cdot 10^4$ cells/well with the Oris™ cell seeding stoppers and allowed to grow overnight. After stoppers removal, conditioned medium of CF-like or PAT (1:10) were added in 500µl of HBSS/BSA 1%/Hepes and cells were allowed to migrate into the detection zone. After 24 hours, cells were treated with calcein AM (Invitrogen), for one hour and fluorescence was measured (Tecan) with the Oris™ mask in place. Results are expressed in percentage of migration, by comparison to the control cells incubated with medium alone.

Wound healing: The cells were seeded on 24 wells plate at a density of $4 \cdot 10^5$ cells/well for 48h. At confluence, they were washed 2 times with Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) supplemented with Bovine Serum Albumin BSA 1% and 10mM Hepes. A vertical mechanical wound was induced in the monolayer with a 0,1-10µL pipette tip. Cells were incubated with 10 times diluted conditioned medium of CF-like or PAT (1:10), in 500µL of HBSS/BSA/Hepes for 48 h. After 24 h of treatment, the medium was replaced by fresh similar medium.

Wounds were photographed at time 0, 24 and 48h and areas were measured with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

The results are expressed in percentage of reparation, by comparison to the control cells incubated with medium alone.

Data analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) was used. Between-group comparison within groups was performed by Student's *t*-test for paired and unpaired data. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS:

Mild inflammation evaluation

The inflamed status and intestinal damage were scored according to an adapted scale of Wallace et al[381]. In the second group of mice, the mildly colonic inflammation was illustrated by two distinct areas i.e non inflamed and mildly inflamed colonic segments (fig 1A). The macroscopic damage scores of the non inflamed colonic segments were similar to those observed in control mice and equal to 0. The mildly inflamed segments were characterized by macroscopic damage scores ≤ 4 including diarrhea and mucosal hyperaemia (fig 1A).

The colonic paracellular permeability of non-inflamed, and mildly inflamed colonic segments.

No difference in CPP was observed between non-inflamed colonic segments collected from mice developing a moderate inflammation and CPP measured in colonic segment from control mice (1.34 ± 0.25 vs. 1.20 ± 0.13 nmol.h⁻¹.cm⁻²) (fig 1B). In contrast, a significant ($p < 0.05$) CPP increase was observed between the mildly inflamed colonic segments from mice moderately inflamed and both with the CPP values of the non-inflamed colonic segments from mice moderately inflamed and colonic segment from control mice (1.92 ± 0.20 vs 1.34 ± 0.25 nmol.h⁻¹.cm⁻²; 1.92 ± 0.20 vs. 1.20 ± 0.13 nmol.h⁻¹.cm⁻², $p < 0.05$, respectively) (fig 1B).

The colonic paracellular permeability of non-inflamed, and mildly inflamed colonic segments after CF-like secretions exposure on the serosal site.

The exposure of CM_{PAT} on serosal site of non-inflamed colonic segments did not have any effect on CPP. In contrast, CM_{CF-like} exposure on the serosal site of non-inflamed colonic

segments significantly increase ($p<0.05$) CPP compared to the same segments non exposed to $CM_{CF-like}$ (fig 1B: 3.47 ± 0.54 vs 1.34 ± 0.25 nmol.h⁻¹.cm⁻², $p<0.01$). Interestingly, the exposure on the serosal site of mildly-inflamed colonic segments did not exacerbate the CPP increase previously observed in the same tissue in basal conditions (fig 1B: 1.80 ± 0.26 vs 1.92 ± 0.2 nmol.h⁻¹.cm⁻²).

Effects of conditioned medium of CF-like in occludin expression

The impact of $CM_{CF-like}$ on the expression of occludin was evaluated in basal and inflamed conditions ($TNF\alpha/IFN\gamma$ pre-treatment) on T84 human colonic cells. The $TNF\alpha/IFN\gamma$ treatment significantly decreased the occludin expression (fig 2A). In basal conditions, treatment of T84 cells with $CM_{CF-like}$ during 12h significantly decreased ($p<0.05$) occludin protein expression (fig 2A). In contrast, in inflamed conditions, the exposure of cells with $CM_{CF-like}$ did not affect the occludin expression levels compared with those measured in cells exposed to $TNF\alpha/IFN\gamma$ alone (fig 2A). The exposure of T84 to CM_{PAT} both in basal and inflamed conditions did not modify the occludin expression.

Cytokine levels in conditioned medium.

The presence of interleukin-6 (fig 2B), monocyte chemoattractant protein-1 (fig 2C) and a low quantity of IL-1 β were detected in $CM_{CF-like}$ (fig 2D). CM_{PAT} showed highest levels of IL-6 and MCP-1 compared to those measured in $CM_{CF-like}$.

Effects of conditioned medium of CF-like in restitution process on T84 colonic human cells.

T84 cells cultivated 48h with $CM_{CF-like}$ showed a significant ($p<0.05$) increase of their ability to proliferate (fig 3A) and to migrate (fig 3B) in comparison with cells exposed to CM_{PAT} or

control medium. Similarly, CM_{CF-like} treatment during 24h improved wound healing (fig 3C) on T84 cells. CM_{PAT} did not display any effect on these parameters in comparison with cells in cultured with control medium alone (fig 3). The levels of IL-6 in CM_{CF-like} were positively correlated with the capacity of these CM_{CF-like} to promote T84 migration cells (fig 4A). Interestingly, no correlation was observed between the IL-6 level measured in CM_{PAT} and on T84 migration cells (4B).

DISCUSSION:

The role of CF in CD pathogenesis remains largely unknown. In order to determine the influence of CF-like secretions, we used an animal model of mild colitis characterized by two distinct inflammatory colonic profiles i.e. non inflamed and mildly inflamed segments. In this study, we demonstrate the different impact of “CF-like” secretions on colonic paracellular permeability according to the inflammatory status of the colonic tissue in DNBS mice. We show that CF-like secretions, exposed to serosal site of the colon, exert a deleterious effect on CPP in non inflamed colonic tissue. In contrast, interestingly, CF-like secretion exposure on mildly inflamed colonic tissue does not exacerbate the increase of CPP. In addition, CF-like secretions play a key role on the restitution of the epithelial barrier by stimulating proliferation, migration and wound-healing on T84 human colonic cells.

The increase of intestinal paracellular permeability is well characterized in IBD patients[393, 394]. In the same way, we observed in mice submitted to a mild inflammation (DNBS 20%), a slight increase of colonic paracellular permeability (CPP), in agreement with other models of colitis[412]. CF-like secretions displayed a dual effect on CPP depending upon the inflammatory status of colonic tissue exposed to CM_{CF-like}. Indeed, in healthy conditions, CM_{CF-like} caused an important increase of CPP whereas no change of CPP occurs in mild inflammatory colon segments. We hypothesized that the degree of inflammation of colonic segments may be responsible of these opposite observations.

The modification of intestinal permeability in IBD and in mice model of colitis can be explained by the reduction in the number of tight junction contacts as well as disruption of the normal strand patterns[412]. Down regulation of occludin and claudins 5 and 8 (the seal-forming tight junction proteins) has been observed in CD patients [188, 190]. A decrease of occludin expression is also described in TNBS-induced colitis in rat[250]. Moreover, IFN γ and TNF α , two pro-inflammatory cytokines, are known to modulate intestinal permeability

through their ability to phosphorylate the myosin light chain[217] [213, 413]. As observed in T84 cells, the co-treatment with TNF α and IFN γ leads to an inflammatory status of cells associated with an increase of permeability[414, 415] and a decrease of occludin expression[415, 416]. Thus, as expected, we denoted a decrease of occludin expression in T84 cells after co-treatment with TNF α and IFN γ . Interestingly, CM_{CF-like} treatment leads to a decrease of occludin expression similarly to that observed in inflammatory condition. It is recognized that TNF α and IFN γ are expressed and secreted by neutrophils and macrophages while the presence has been described both in CF developed in CD patients[354] and in animal model[411]. Thus the decrease expression of occludin could be link to the presence of TNF α and/or IFN γ in CM_{CF-like}. While CM_{CF-like} increase occludin expression levels in control conditions, it did not enhance occludin levels under inflammatory conditions in T84 cells exposed to pro-inflammatory cytokines i.e TNF α and IFN γ . As observed with CPP, CM_{CF-like} had a dual effect in occludin expression depending upon inflammatory status of T84 cells. Cells treated with TNF α and IFN γ show an alteration of cells morphology[414], suggesting that inflammatory status may promote differential receptor expression, leading to altered response of T84 cells to CM_{CF-like} treatment. Therefore, although CF is an inflammatory tissue our data show that its secretions do not exacerbate intestinal permeability by modifying occludin expression in inflammatory conditions.

As previously described in CD patients and cells treated with pro-inflammatory cytokines[414], increase of intestinal permeability is associated with erosion, apoptosis, and necrosis of epithelial cells. The integrity of the intestinal mucosal surface barrier is rapidly re-established even after extensive destruction because of an enormous regenerative ability of the mucosal surface epithelium. Rapid resealing of the surface epithelium is accomplished by epithelial cell differentiation, proliferation, and migration, also referred to as epithelial “restitution”[417]. In refractory case of CD, epithelium repair is disturbed, illustrated by

persistent ulcers lesions of the intestine. Complete remission of this disease requires both the disappearance of inflammation and the repair of the damaged epithelium[418]. Therefore the investigations of various cells mediators that may contribute to wound healing attract the attention. Among these mediators, IL-6 and macrophages appear as good candidates. In humans[419] as well as in animal models[420], the local IL-6 expression was found to participate in colonic healing anastomosis. Moreover, mice with IL-6 deficiency showed a defect of cutaneous wound healing associated with a defect of macrophages infiltration in the site of injury[421]. It is noteworthy that macrophages can present either a tissue destructive or repair activities [422]. In a model of skeleton muscle damage, massive macrophage infiltration is observed at the site of injury and involved in the muscle healing processes [423]. In an animal model leading to CF-like development, we have shown that mRNA encoding to IL-6 and F4/80 (a macrophage marker) were highly expressed in “CF-like” tissue. Moreover, we report herein the presence of IL-6 in CM_{CF-like}. Thus we can suggest that the increase of proliferation, migration and wound healing observed in T84 cells treated with CM_{CF-like} could be, in part link to IL-6 and macrophages secretions found in CM_{CF-like}. This hypothesis is reinforced by a positive correlation between IL-6 levels measured in conditioned medium and the capacity of CM_{CF-like} to promote T84 migration.

Therefore, CF-like may play a double positive role: first a protective one against colonic perforation via a sleeve formation around the ulcerative colonic segment[354], preventing gut content leakage and possible endotoxemia shock; and second a role in colonic wall healing though its secretions. Beside, these original data suggest also a dual effect of CF-like secretions according to the inflammatory status of the colonic tissue. CF-like tissue via its secretions, could be involved in the increase of colonic paracellular permeability and the decrease of occludin expression leading to gut inflammation of non-inflamed colonic segment (whereas has no effect on CPP in inflammatory conditions), and also could have a positive

role in healing process in inflammatory colonic tissue. This study contributes in a better understanding of the role of creeping-fat in the pathophysiology of Crohn's disease; particularly we pointed out the ability of CF to repair intestinal epithelial damage. Since CF is chronically present in CD patients, more investigations are needed in order to evaluate its effect in non-inflamed tissue in Crohn's disease.

1. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;108:1566-81.
2. Ukabam SO, Clamp JR, Cooper BT. Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon. *Digestion* 1983;27:70-4.
3. Pearson AD, Eastham EJ, Laker MF, Craft AW, Nelson R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;285:20-1.
4. Welcker K, Martin A, Kolle P, Siebeck M, Gross M. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res* 2004;9:456-60.
5. Jenkins RT, Ramage JK, Jones DB, Collins SM, Goodacre RL, Hunt RH. Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clin Invest Med* 1988;11:151-5.
6. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437-9.
7. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1163-9.
8. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, Collins JE. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 2005;85:1139-62.
9. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
10. Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, McKay DM, Sherman PM, Croitoru K, Perdue MH. Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* 2004;53:1817-24.
11. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2000-4.
12. Fais S, Capobianchi MR, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F. Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res* 1994;14:235-8.
13. Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1539-43.
14. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127:80-93.
15. Adams RJ, Heazlewood SP, Gilshenan KS, O'Brien M, McGuckin MA, Florin TH. IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's disease than IgG against mannan or flagellin. *Am J Gastroenterol* 2008;103:386-96.
16. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541-9.
17. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G,

- Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:876-85.
18. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:721-32.
19. Mammen JM, Matthews JB. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* 2003;31:S532-7.
20. Dignass AU, Stow JL, Babyatsky MW. Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta. *Gut* 1996;38:687-93.
21. Zbar AP, Simopoulos C, Karayiannakis AJ. Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. *J Gastroenterol* 2004;39:413-21.
22. Dignass AU, Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function in vitro. *Exp Cell Res* 1996;225:422-9.
23. Hu Y, Liang D, Li X, Liu HH, Zhang X, Zheng M, Dill D, Shi X, Qiao Y, Yeomans D, Carvalho B, Angst MS, Clark JD, Peltz G. The role of interleukin-1 in wound biology. Part I: Murine in silico and in vitro experimental analysis. *Anesth Analg*;111:1525-33.
24. Hu Y, Liang D, Li X, Liu HH, Zhang X, Zheng M, Dill D, Shi X, Qiao Y, Yeomans D, Carvalho B, Angst MS, Clark JD, Peltz G. The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies. *Anesth Analg*;111:1534-42.
25. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc* 1932;99:1323-9.
26. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, Shepherd NA. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg* 1992;79:955-8.
27. Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research? *Gut* 2005;54:742-4.
28. Borley NR, Mortensen NJ, Jewell DP, Warren BF. The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link. *J Pathol* 2000;190:196-202.
29. Olivier I, Theodorou V, Valet P, Castan-Laurell I, Guillou H, Bertrand-Michel J, Cartier C, Bezirard V, Ducroc R, Segain JP, Portier G, Kirzin S, Moreau J, Duffas JP, Ferrier L, Eutamene H. Is Crohn's creeping fat an adipose tissue? *Inflamm Bowel Dis*.
30. Olivier I, Theodorou V, Valet P, Castan-Laurell I, Guillou H, Bertrand-Michel J, Cartier C, Bezirard V, Ducroc R, Segain JP, Portier G, Kirzin S, Moreau J, Duffas JP, Ferrier L, Eutamene H. Is Crohn's creeping fat an adipose tissue? *Inflamm Bowel Dis* 2010.
31. Wallace JL, Keenan CM, Cucala M, Mugridge KG, Parente L. Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 1992;102:1176-85.
32. Olson TS, Reuter BK, Scott KG, Morris MA, Wang XM, Hancock LN, Burcin TL, Cohn SM, Ernst PB, Cominelli F, Meddings JB, Ley K, Pizarro TT. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006;203:541-52.
33. Zwiers A, Fuss IJ, Leijen S, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. Increased expression of the tight junction molecule claudin-18 A1 in both experimental colitis and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1652-9.
34. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos CA, Nusrat A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005;16:5040-52.

35. Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G422-30.
36. Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G496-504.
37. Fish SM, Proujansky R, Reenstra WW. Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut* 1999;45:191-8.
38. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003;171:6164-72.
39. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 11):2085-90.
40. Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:68-77.
41. Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 2005;50 Suppl 1:S34-8.
42. Ishimura K, Tsubouchi T, Okano K, Maeba T, Maeta H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression. *World J Surg* 1998;22:1069-75; discussion 1076.
43. Greca FH, Souza Filho ZA, Giovanini A, Camargo Junior CA, Rubin MR, Silva RF. Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats. *Acta Cir Bras* 2007;22:110-4.
44. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, Kozma SC, Drew AF. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol* 2010;184:7219-28.
45. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments
10.1189/jlb.0504272. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-513.
46. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007;204:1057-69.

Figure 1

A



B

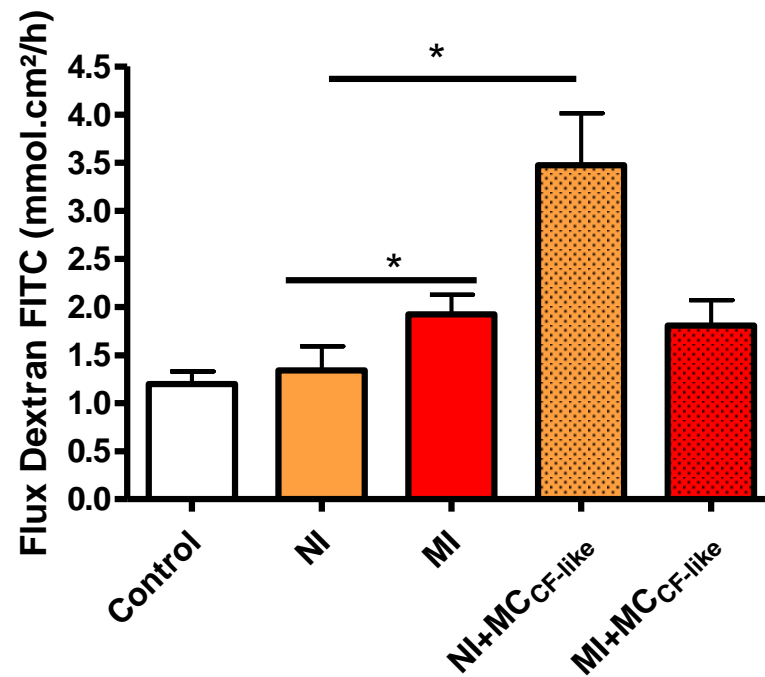


Figure 1: **A:** Mice developing moderate inflammation showed two different colonic segment areas: non-inflamed (NI) and mildly inflamed (MI) colonic segments. **B:** Colonic para-cellular permeability was evaluated in Ussing chamber on control, non-inflamed and mildly inflamed colonic segments exposed (n=9) or not (n=5) with CM_{CF-like} on serosal site of the tissue. Data are expressed as means \pm SEM *P<0.05 vs. control.

Figure 2

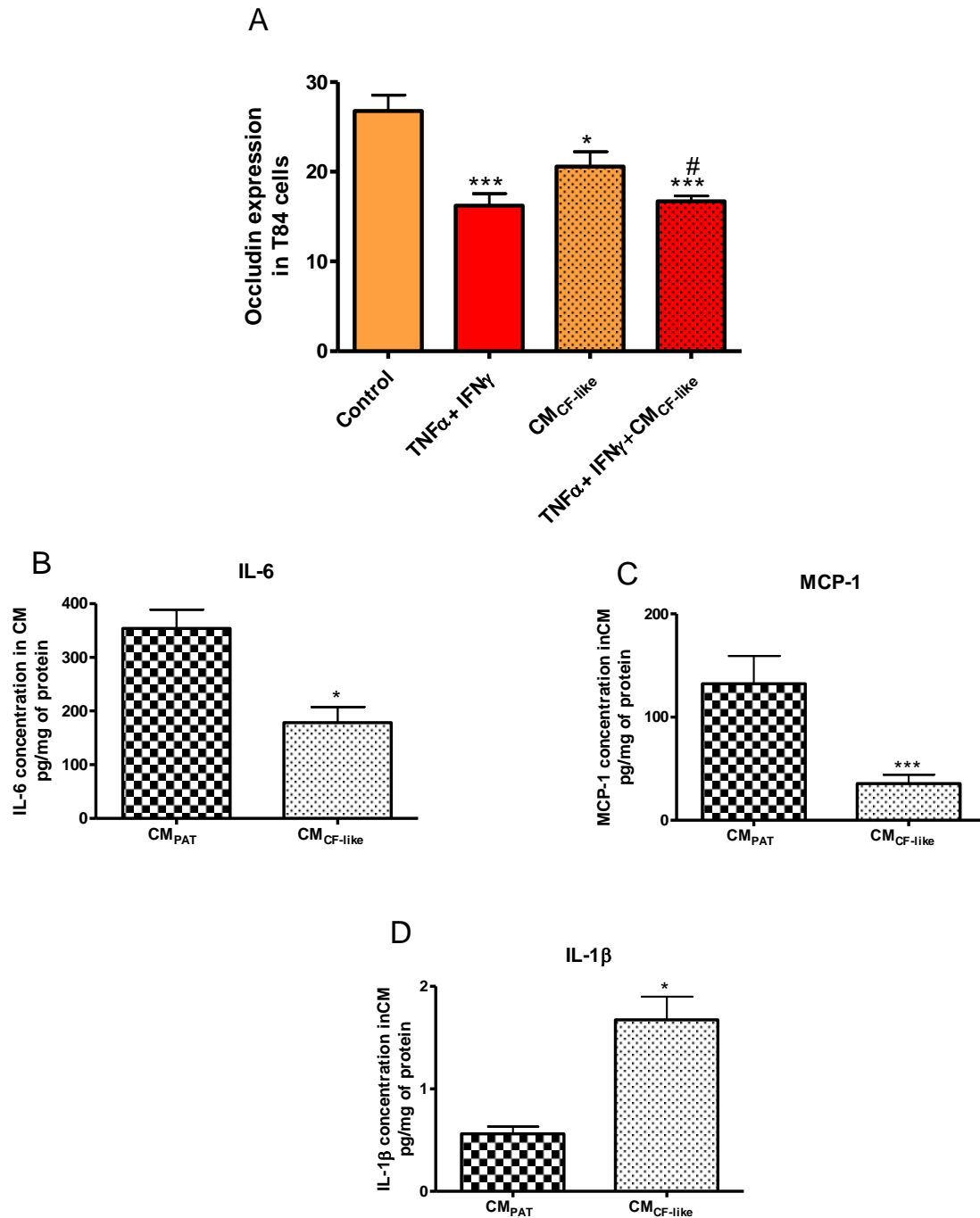


Figure 2: A: The occludin expression in T84 cells was evaluated by western-blot in-cell in control or inflammatory condition (TNF α +IFN γ) exposed or not with CM_{CF-like}. Data are expressed as means \pm SEM (n=6), ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 vs. control, #<0.05 vs CM_{CF-like}. Concentration of IL-6 (**2B**), MCP-1 (**2C**) and IL-1 β (**2D**) in CM_{PAT} and CM_{CF-like} was evaluated by ELISA dosage. Data are expressed as means \pm SEM (n=10), ***P<0.001 and *P<0.05 vs. CM_{PAT}.

Figure 3

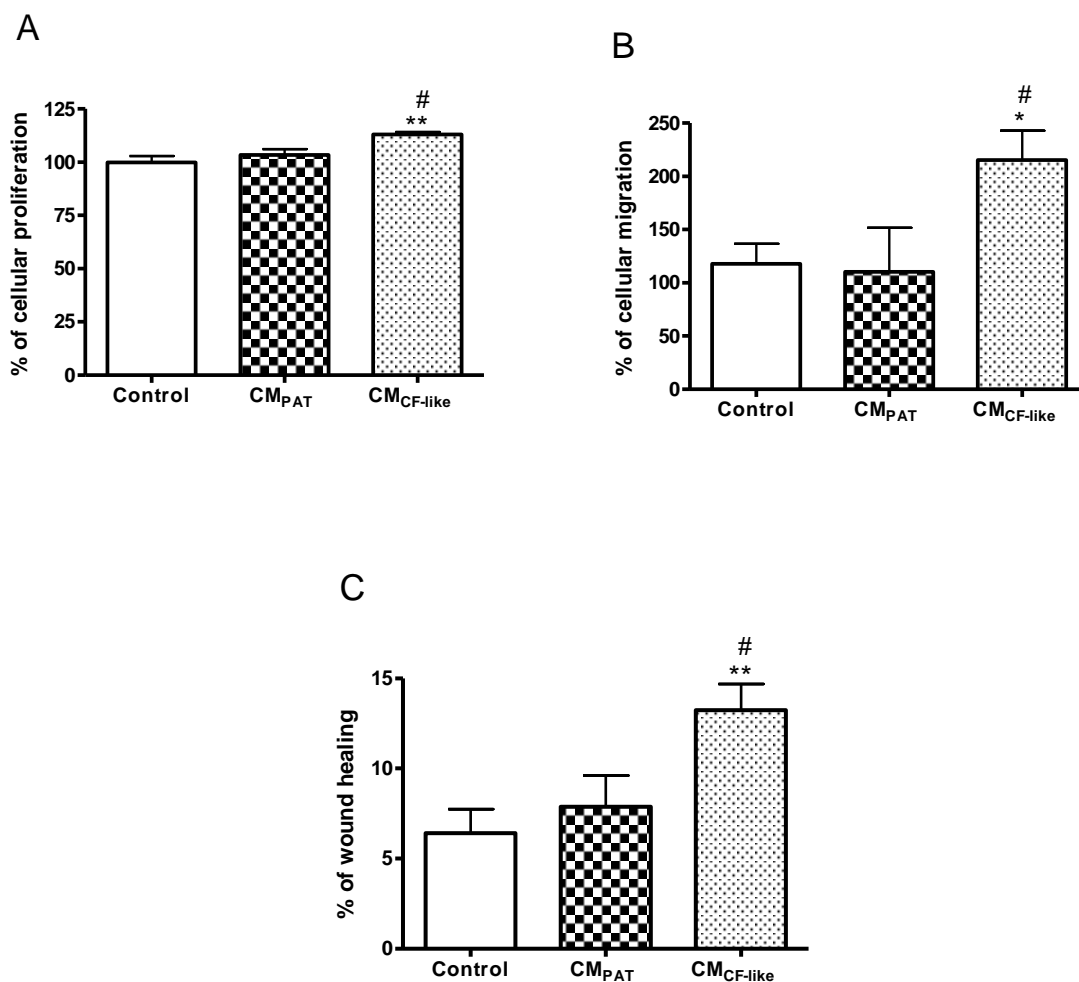


Figure 3: The effect of CM_{CF-like} in restitution process on T84 cells was evaluated. T84 cells were cultured with control medium or with CM_{PAT} or CM_{CF-like}. The percentage of cellular proliferation (n=5) (**2A**), cellular migration (n=10) (**2B**) and capacity of wound healing (n=20) (**2C**) were measured. Data are expressed as means \pm SEM, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 vs. control and #<0.05 vs. CM_{PAT}.

Figure 4

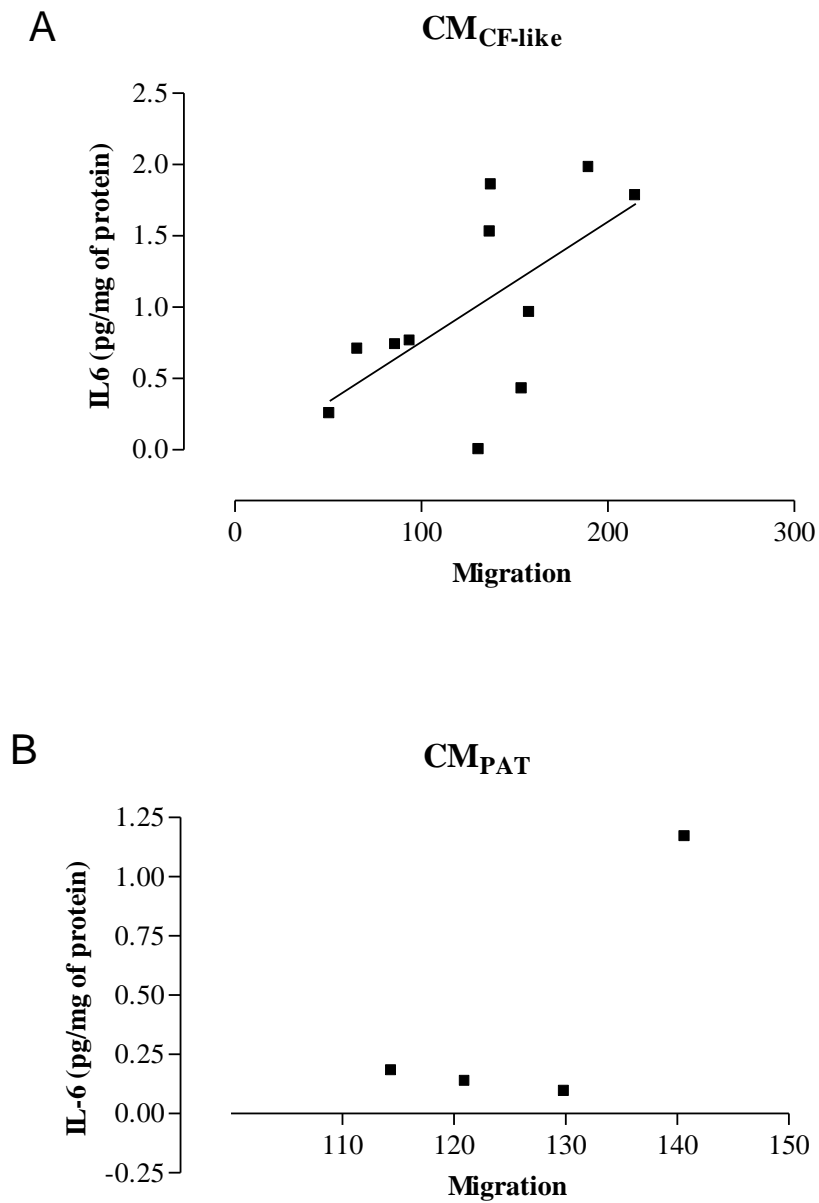


Figure 4: IL-6 concentration in $CM_{CF-like}$ was positively correlated with the capacity of $CM_{CF-like}$ to induce T84 cells migration (**4A**) (n=12). No correlation was observed between IL-6 concentration in CM_{PAT} and T84 cells migration (**Fig 4**) (n=5).

PARTIE 3

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Le tissu adipeux (TA) est couramment décrit pour son implication dans le maintien du métabolisme énergétique. Depuis ces dix dernières années il est également défini comme un organe hautement endocrine. En effet, le TA est capable de sécréter de nombreuses protéines biologiquement actives regroupées sous le terme d'adipokines. Ces adipokines peuvent intervenir dans de nombreux processus biologiques dont la réponse inflammatoire [256, 323]. La maladie de Crohn (MC) est une des deux principales formes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les patients atteints de MC montrent une hypertrophie du TA mésentérique (TAM). De plus, le développement d'un tissu ectopique d'aspect adipo-adipeux « gainant » les zones ulcérées de l'intestin est observé chez 100% des patients opérés pour une résection iléo-caecale. Ce tissu, couramment appelé creeping-fat (CF) est décrit comme une extension du TAM. Cependant, malgré la description du CF en 1932 lors de la description de la MC par le Dr Crohn lui-même, la nature exacte ainsi que l'implication du CF dans la physiopathologie de la MC n'ont jamais réellement été étudiées.

Au cours de cette thèse, nous avons en premier lieu étudié les modifications géniques du TAM dans deux modèles murins de colite expérimentale chimio-induite par l'administration de DSS ou de DNBS. Dans un second temps, la mise en place et la standardisation d'une colite expérimentale induite par le DNBS et entraînant le développement de CF, nous a permis d'étudier la nature et l'implication du CF dans la physiopathologie de la colite expérimentale.

De nombreux modèles animaux sont maintenant disponibles et largement utilisés pour étudier la pathogénèse des MICI. Parmi les plus couramment utilisés, les modèles de colite chimio-induite par des administrations de DSS ou de TNBS et/ou DNBS sont largement décrits [225]. L'administration chronique de DSS provoque une inflammation qui entraîne des altérations immunitaires et intestinales proches de celles observées au cours d'une RCH [233] alors qu'une instillation intra-colique de DNBS entraîne des altérations proches de celles observées au cours d'une MC [225].

Lors de nos études, le statut inflammatoire colique des animaux a été évalué à l'aide d'une grille de scores lésionnels macroscopiques (SLM) adaptée d'après Wallace [381], incluant notamment les paramètres suivants : l'épaississement de la muqueuse, l'hyperémie, et les niveaux d'ulcération de la muqueuse. Pour des SLM inférieurs ou égaux à 4, indiquant chez l'animal une hyperémie et un épaississement de la muqueuse colique accompagnés de diarrhée, nous avons qualifié la réponse inflammatoire colique de type « modérée » (Figure 31). Cette inflammation dite modérée est retrouvée chez 100% des animaux traités au DSS

par voie orale et chez 40% des animaux instillés par voie intra-colique au DNBS (Figure 31). Pour des SLM strictement supérieurs à 4 illustrant la présence de diarrhée, d'ulcération sur une ou plusieurs zones de la muqueuse colique et de tissu adipeux rampant « CF-like », nous avons qualifié la réponse inflammatoire colique de type « sévère » (Figure 31). Cette inflammation dite « sévère » est uniquement retrouvée chez 40% des animaux instillés au DNBS

Les animaux ont donc été classés en deux catégories ; les animaux développant une inflammation colique dite « modérée » et les animaux développant une inflammation dite « sévère ».

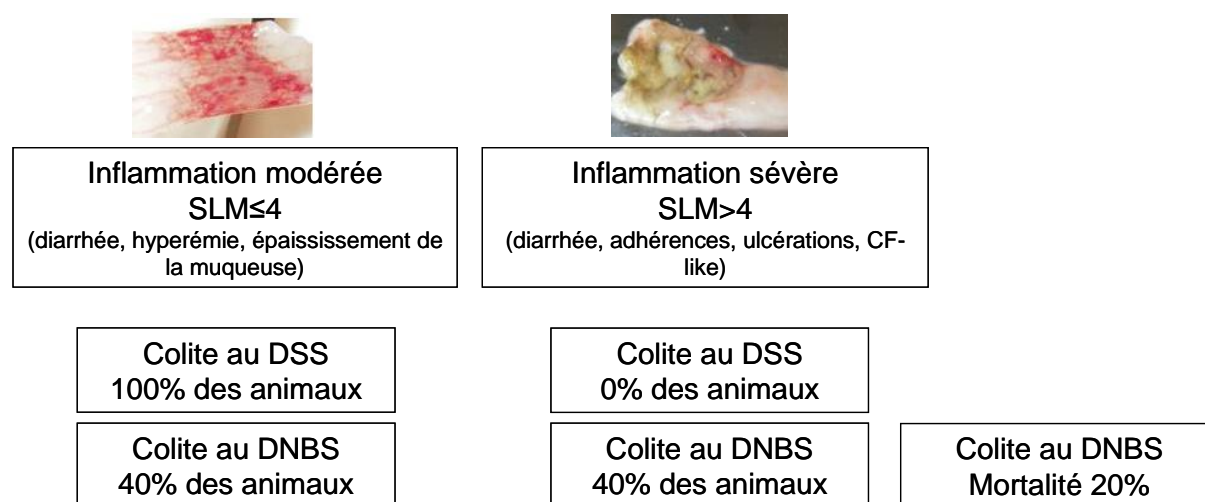


Figure 31. Obtention et caractérisation d'une colite « modérée » ou « sévère ».

LES MODIFICATIONS DU TAM EN REPONSE A UNE INFLAMMATION COLIQUE EXPERIMENTALE

Les patients atteints de MICI et plus particulièrement de MC, montrent des modifications du profil d'expression des marqueurs adipeux et inflammatoires au niveau du TAM et une hypertrophie de ce dernier [353, 354]. Cependant, l'implication du TAM et les conséquences de son hypertrophie dans l'étiologie de la MC restent encore mal connues.

Nous avons évalué, dans les deux modèles de colite expérimentale chimio-induite utilisés, les modifications géniques du TAM en fonction de la sévérité de la réponse inflammatoire colique *i.e.* « modérée » et « sévère ». Dans notre étude, le TAM comprenait à la fois le tissu adipeux perinodal (entourant les ganglions lymphatiques mésentériques) et le tissu adipeux retrouvé au niveau de l'anse caecale.

Perte du profil adipeux du TAM et acquisition d'un profil inflammatoire:

L'induction d'une colite « modérée », au DSS ou au DNBS, a provoqué une diminution de la masse corporelle des animaux et de la masse du TAM. Une diminution de l'expression des gènes codant pour la leptine et l'adiponectine au niveau du TAM a également été observée chez ces animaux. Les taux circulants d'adiponectine sont également significativement diminués. Sur le même schéma, chez les souris développant une colite « sévère », le TAM montre une perte du profil adipeux (effondrement de l'expression de la leptine et d'adiponectine) plus importante en comparaison à celle observée chez les animaux développant une colite « modérée ».

Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de Gambero *et al* décrivant une augmentation de la sécrétion de la leptine et de l'adiponectine par le TAM après induction d'une colite au TNBS chez le rat [368]. De même, chez l'homme les expressions de la leptine et de l'adiponectine sont augmentées au niveau du TAM chez les patients atteints de la MC en comparaison au TAM de sujets contrôles [363]. Toutefois, une hypertrophie du TAM est associée à ces différentes données expérimentales et cliniques. Lors de nos études, dans les deux modèles de colite expérimentale chimio-induite utilisés, aucune hypertrophie du TAM n'a été retrouvée. La sécrétion des adipokines dépend à la fois du nombre et de la taille des adipocytes [259, 297], suggérant qu'une hypertrophie du TAM s'associe à une augmentation de la sécrétion de la leptine et de l'adiponectine et qu'une diminution de la masse du TAM, comme observée dans nos modèles, s'accompagne d'un effondrement de l'expression de ces deux adipokines.

Par ailleurs, après l'administration chronique de DSS, le métabolisme énergétique et l'activité locomotrice des souris sont diminués ; ces effets sont associés à une diminution de la prise alimentaire et de la masse grasse [383]. De façon exclusive, nous avons observé une diminution de l'expression de la lipase hormono-sensible (LHS), hormone impliquée dans la lipolyse, au niveau du TAM chez les animaux développant une colite « sévère ». Ainsi, une altération du métabolisme énergétique pourrait donc expliquer la diminution de la masse corporelle des animaux et de la masse du TAM entraînant une diminution de l'expression de la leptine et de l'adiponectine retrouvée dans nos deux modèles de colite chimio-induite.

L'induction d'une colite « modérée » par le DSS et le DNBS a également entraîné une augmentation de l'expression génique des marqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, la MCP-1 et le marqueur macrophagique F4/80 dans le TAM. Les animaux développant une colite « sévère » montrent une exacerbation du profil inflammatoire du TAM ainsi qu'une infiltration de polynucléaires neutrophiles dans ce tissu. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant la nature inflammatoire du TAM lors d'une colite expérimentale au TNBS chez le rat [375, 388, 389] et chez les patients souffrants de MC. Toutefois, les mécanismes à l'origine de l'inflammation du TAM et les conséquences de cet état inflammatoire du TAM dans la physiopathologie de l'inflammation intestinale restent à préciser.

Interrelations entre les modifications du TAM et l'inflammation intestinale :

L'inflammation intestinale entraîne une altération de sa fonction de barrière illustrée par une augmentation de la perméabilité intestinale [393, 394] et de la translocation bactérienne systémique aussi bien chez l'homme [398, 399] que chez l'animal [424]. Chez des sujets « sains », un niveau basal de translocation bactérienne au niveau du TA périnodal a été décrit [350] ; cette translocation bactérienne est augmentée de façon significative au niveau du dépôt adipeux périnodal chez des patients atteints de MC [352]. Cette altération de la barrière intestinale pourrait donc être à l'origine des modifications du TAM observées lors d'une inflammation intestinale.

Les récepteurs PRR (pattern recognition receptor) tels que les TLRs (Toll Like Receptor) et les NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) sont présents aussi bien au niveau des entérocytes, des cellules immunitaires, des adipocytes, des préadipocytes et des cellules de la fraction stroma vasculaire [345]. Dans son ensemble, le TAM exprime tout les types de TLRs (TLR-1 à TLR-10) [339]. L'exposition au LPS, de préadipocytes en culture, via l'activation

des TLR-4, diminue l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique [425], l'expression des adipokines et inhibe la différenciation adipocytaire [341]. La stimulation directe par du LPS des ganglions lymphatiques mésentériques, enveloppés par du TA périnodal, entraîne une augmentation du nombre d'adipocytes, associée à une diminution de leur volume et de leur contenu lipidique [384]. Ainsi, nous pouvons suggérer que la réponse du TAM aux antigènes microbiens comme le LPS, en provenance de la rupture de la barrière intestinale, pourrait contribuer à la perte du profil adipeux et/ou à l'hypertrophie du TAM observées dans la MC et dans les modèles de colite expérimentale chimio-induite utilisés dans cette étude (Figure 32).

D'autre part, la stimulation des TLR-1, TLR-3 et TLR-4 par leurs ligands spécifiques provoque une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL-6 et de MCP-1 par les adipocytes matures 3T3-L1 [339]. De la même manière, chez l'homme, une activation des TLR-2 et TLR-4 entraîne une augmentation de l'expression d'IL-6 au niveau du TA entier [23] et une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 par des adipocytes isolés; sécrétion plus importante en réponse à la stimulation des TLR-4 [342, 345]. Par ailleurs, le TA des animaux, ayant subi une mise en régime gras et déficients pour le TLR4, montrent une diminution de l'expression de MCP-1 [426] et de l'infiltration en macrophages en comparaison au TA des animaux sauvages mis en régime gras. Sur la base de cette littérature, nous pouvons suggérer que l'activation des TLRs pourrait être à l'origine du statut inflammatoire du TAM observé dans les deux modèles utilisés dans notre étude et illustré par une augmentation de l'expression d'IL-6, de MCP-1 et un infiltrat de macrophages au niveau du TAM. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la présence ou non de LPS au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques et du TAM afin de confirmer la translocation bactérienne dans ces tissus. Dans un second temps, une évaluation des modifications de l'expression des TLRs au niveau du TAM en condition de colite expérimentale serait à envisager.

Les travaux de Catherine Pond montrent une augmentation du nombre de cellules dendritiques [427] au niveau du TA périnodal, après stimulation au LPS des ganglions lymphatiques mésentériques. Au cours de notre étude nous avons observé une augmentation de l'activité myéloperoxydase, et une surexpression du marqueur F4/80, reflétant respectivement un infiltrat de polynucléaires neutrophiles et de macrophages au niveau du TAM des animaux développant une inflammation intestinale « sévère ». Dans les deux modèles de colite utilisés la surexpression et la sécrétion de MCP-1 par le TAM peut participer au chimiotactisme des macrophages au niveau de ce tissu [387, 428]. Par ailleurs,

un lignage commun entre les macrophages et les préadipocytes est largement suggéré dans la littérature [266]. En conditions inflammatoires, les préadipocytes peuvent acquérir une capacité de phagocytose, une expression à leur surface de marqueurs macrophagiques [266] et inflammatoires [425]. Ainsi, les macrophages présents dans le TAM peuvent être issus d'un recrutement de macrophages circulants ou de la différenciation des préadipocytes. Une façon d'identifier l'origine des macrophages, présents dans le TAM serait de recourir à l'administration de la toxine diphtérique avant l'induction d'une colite expérimentale. En effet, ce traitement à la toxine diphtérique conduit à une déplétion en monocytes circulants [423].

Comme décrit dans la partie introductive, plusieurs sous populations de macrophages sont maintenant clairement définies [99]. En conditions physiologiques, les macrophages du TA, produisent de l'IL-10 et du TGF β et présentent un phénotype de type M2 « anti-inflammatoire ». Au cours du développement de l'obésité, où le TA présente un état micro-inflammatoire, les macrophages du TA sécrètent principalement du TNF α et de l'IFN γ et montrent un profil de type M1 « pro-inflammatoire » [272]. Des travaux menés chez la souris obèse ont montré que les macrophages du TAM présentent un phénotype de type M1 après induction d'une colite au DSS [429]. Cependant, cette étude ayant été menée chez des animaux obèses, il serait nécessaire de distinguer la part de l'implication de la colite et de l'obésité dans cette modification phénotypique des macrophages.

Au niveau du TA, l'activation des TLRs4 par le LPS active la lipolyse et provoque la libération d'acides gras par ce tissu [430], qui peuvent, en retour, activer les TLRs4 exprimés à la surface des macrophages et provoquer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces derniers [348]. Cependant seuls les acides gras saturés sont capables de stimuler l'expression de marqueurs inflammatoires au niveau des macrophages, action inhibée par les acides gras insaturés, comme l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque [347]. Une boucle de régulation se met alors en place entre les cellules adipeuses et les macrophages au niveau du TA.

Dans nos travaux, l'expression d'IL-6 et de MCP-1 étant augmentée, nous pouvons supposer un phénotype de type M1 des macrophages présents dans le TAM au cours de la colite expérimentale. Cependant, il serait nécessaire de définir la nature exacte de ces macrophages grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques des macrophages de type M1 ou M2 tels que le CD16 et le CD206 respectivement pour les macrophages de type M1 ou M2.

En conclusion, l'ensemble de ces données permet de proposer le schéma suivant : la rupture de la barrière intestinale en conditions inflammatoires modifie la réponse du TAM, induisant un changement de son profil adipeux et l'acquisition de son profil inflammatoire (Figure 32). Cependant, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par le TAM peuvent également modifier la perméabilité et le statut inflammatoire intestinal.

Le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\gamma$ sont deux cytokines sécrétées par le TAM inflammatoire [314] et clairement définies comme entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale en modifiant l'expression des protéines de jonctions épithéliales aussi bien chez l'homme [416], que dans des modèles animaux et de culture cellulaire [414]. L'IL-6 est également une cytokine impliquée dans le dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale et largement libérée par le TAM [431]. Les souris déficientes en IL-6, soumises à un choc hémorragique sont protégées d'une augmentation de la perméabilité intestinale et de la translocation bactérienne normalement observées dans ces conditions physiopathologiques au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques [431]. Comme nous l'avons déjà décrit, dans les deux modèles de colite expérimentale chimio-induite utilisés dans cette étude, une surexpression de l'IL-6 au niveau du TAM ainsi qu'une augmentation de ses taux circulants ont été observées. Cette augmentation d'IL-6 pourrait participer au dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale et indirectement au maintien de l'inflammation intestinale.

Outre l'implication de l'IL-6 dans la rupture de la barrière épithéliale intestinale, elle est en association avec le $\text{TGF}\beta$, largement impliquée dans la différenciation de cellules Th17 et dans l'inhibition des lymphocytes T régulateurs [130, 432]. Les lymphocytes Th17 via la sécrétion d'IL-17, jouent un rôle crucial dans la mise en place de maladies auto-immunes dont la MC [433]. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire qui stimule l'activation d'autres cytokines comme l'IL-6 et le $\text{TNF}\alpha$ [434]. Elle est également impliquée de façon positive dans le recrutement et l'activation de polynucléaires neutrophiles et de macrophages [435]. L'IL-17 est surexprimée dans la muqueuse intestinale et dans les ganglions lymphatiques mésentériques de patients souffrants de MC [436, 437]. La sur-activation des lymphocytes Th17 et l'augmentation de leur nombre participent au développement et/ou à l'entretien de l'inflammation intestinale [73].

Par ailleurs, en condition physiologique, l'IL-6 sécrétée par le TA représente 30% des taux circulants de cette interleukine. Ainsi, l'augmentation de l'expression de l'IL-6 au niveau du TAM pourrait participer au déséquilibre de la balance Th17/Treg et à l'augmentation des taux circulants de l'IL-17, augmentation retrouvée au niveau plasmatique chez les patients atteints

de la MC [372]. Ce déséquilibre de la balance Th17/Treg serait impliqué dans l'induction et/ou le maintien de l'inflammation intestinale (Figure 32).

En conclusion de cette partie, visant à explorer les modifications du TAM au cours de colites expérimentales, nos travaux de recherche ont mis en évidence une perte du profil adipeux et l'acquisition d'un profil inflammatoire du TAM lors d'une colite « modérée », ces paramètres sont exacerbées lors d'une colite « sévère ». En corrélation avec la littérature, nous pouvons proposer un schéma décrivant une boucle de régulation bidirectionnelle paracrine entre le TAM inflammatoire et le dysfonctionnement la barrière intestinale (Figure 32).

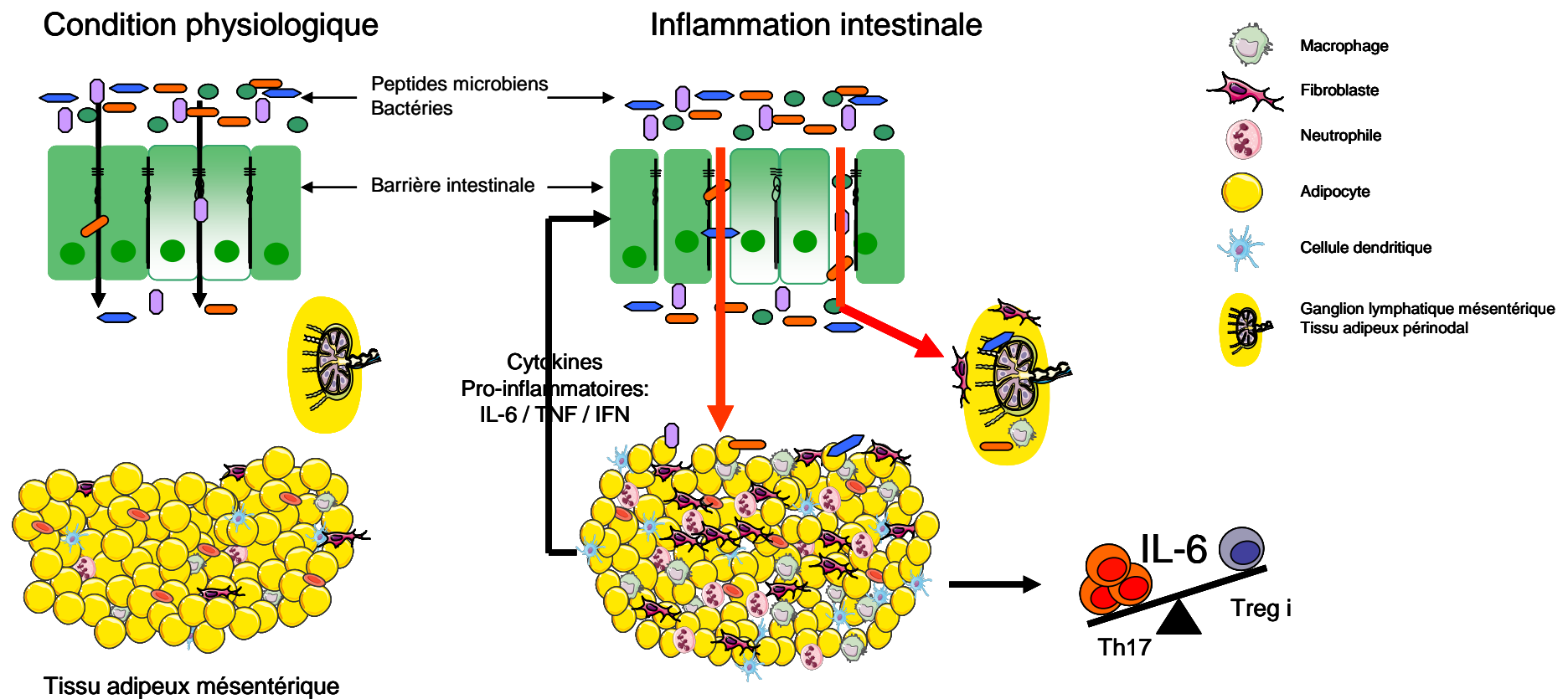


Figure 32. Interrelation bidirectionnelle entre le tissu adipeux mésentérique et la barrière intestinale.

L'inflammation intestinale induit une augmentation de la perméabilité intestinale entraînant une translocation bactérienne plus importante. Les bactéries via l'activation des récepteurs TLRs vont modifier le phénotype du TAM et du tissu adipeux périodol. Ces modifications s'illustrent par une hypertrophie du TAM, une diminution de la taille des adipocytes, une perte du profil adipocytaire ainsi que par une infiltration de cellules inflammatoires et fibreuses. Le TAM, possédant alors un profil inflammatoire, va sécréter de manière plus importante des cytokines pro-inflammatoires pouvant participer à la dérégulation de la fonction de barrière et de la réponse inflammatoire observée au cours de la MC.

MISE EN PLACE ET DESCRIPTION D'UN MODELE MURIN DE CREEPING-FAT.

L'hypertrophie du TAM et la présence de creeping-fat (CF) sont deux caractéristiques de la MC. Le CF, spécifique de la MC, est défini comme une extension du TAM enveloppant au minimum 50% de la circonférence intestinale du côté anti-mésentérique, au niveau des zones inflammatoires [354]. Aucune autre pathologie humaine n'entraîne la formation de cette gaine d'aspect adipo-fibreux autour de l'intestin. Bien que la présence de ce tissu soit récurrente chez les patients souffrant de MC et qu'il soit utilisé comme marqueur de la sévérité de la pathologie, peu d'informations sur ce tissu ectopique sont disponibles. Pour illustration, sur le moteur de recherche « PubMed », le mot creeping-fat est associé à seulement 22 publications depuis 1977. Ce manque de données pourrait s'expliquer par la difficulté à étudier ce tissu sur des modèles pré-cliniques. En effet, quelque soit les modèles expérimentaux utilisés afin d'induire une colite expérimentale pour en comprendre les mécanismes physiopathologiques, aucun n'a décrit la présence de CF chez l'animal. La mise en place d'un modèle de colite expérimentale entraînant le développement de CF, chez le rongeur, nous a donc semblé nécessaire afin d'élucider au mieux sa nature et son implication dans la physiopathologie de la MC.

Dans ce contexte, nous avons standardisé un modèle de colite induite à l'acide di-nitrobenzène sulfonique (DNBS) chez la souris, entraînant le développement d'un tissu « CF-like ». La mise en place de ce modèle a nécessité une mise au point importante et repose sur une combinaison stricte de plusieurs paramètres jamais décrite dans la littérature. Les souris utilisées sont des mâles de souche balb/c (Charles River), pesant 23 grammes et âgées de sept à huit semaines. Ces animaux sont instillés par voie intracolique avec 100µL d'une solution de DNBS à une concentration de 260mg/kg diluée dans 50% d'éthanol. Après l'instillation intracolique, les souris sont maintenues sur une plaque chauffante à 30°C et sacrifiées trois jours après instillation. Ce délai correspondant au pic de l'inflammation colique dans notre modèle. Le respect de chacun de ces paramètres est nécessaire pour la mise en place et l'obtention d'un modèle reproductible. En effet, lors de plusieurs essais, nous avons pu noter par exemple que le DNBS à cette dose entraîne des atteintes inflammatoires coliques plus reproductibles que le TNBS. L'âge et le poids des souris ont été des paramètres également très importants à déterminer. En effet, la dose de DNBS utilisée étant volontairement très élevée, elle entraîne un taux de mortalité trop important chez des souris plus jeunes et moins

corpulentes. *A contrario*, des souris plus âgées et d'une masse corporelle supérieure montrent une meilleure résistance à l'induction de l'inflammation colique sans développer de tissu « CF-like ». Comme nous l'avons décrit plus haut, le suivi rigoureux de ce protocole a permis le développement d'une colite sévère, définie par des scores lésionnels macroscopiques strictement supérieurs à 4 et caractérisée par la présence de zones d'ulcération de la muqueuse, et de « CF-like » chez 40% des animaux. Le « CF-like » présentait un aspect adipo-fibreux et gagnait systématiquement les zones ulcérées coliques du côté anti-mésentérique. Nous avons également mis en évidence que la présence de ce tissu « CF-like » était transitoire. En effet, sept jours après instillation au DNBS, période de « rémission » naturelle de l'inflammation colique, aucune trace de « CF-like » chez la souris n'a été retrouvée. Aussi, en accord avec la littérature existante chez l'homme [356], nous avons décrit une corrélation positive entre la présence de « CF-like » et la sévérité de l'inflammation colique. Chez l'homme, l'origine du CF est couramment associée à une hyperplasie et/ou une hypertrophie du TAM. Comme décrit précédemment, dans notre modèle, aucune hypertrophie du TAM n'a été observée. L'origine du « CF-like » murin ne peut donc être associée à une extension du TAM. Cependant, l'apparition rapide et transitoire du « CF-like » dans notre modèle pourrait suggérer que ce tissu ait pour origine du tissu mésentérique recruté et modifié au contact des zones intestinales inflammatoires.

Le « CF-like » obtenu, ne possède pas les fonctions métaboliques d'un TA classique. En effet, il n'exprime ni la périlipine (protéine des gouttelettes lipidiques), ni la LHS (hormone nécessaire à la lipolyse) et ne stocke pas de triglycérides, fonction majeure du TA. De plus, le « CF-like » n'exprime quasiment pas de leptine et d'adiponectine, deux adipokines majeures du TA. Ainsi, dans notre modèle, le tissu « CF-like » ne présente pas une nature adipeuse. Parmi les échantillons humains de tissu adipeux sous-cutané, de TAM et de CF, collectés chez des patients souffrant d'une MC et opérés pour une résection, seul le CF montre une moindre expression de leptine, d'adiponectine et de LHS *vs.* le TAM. Ces résultats ne sont pas en accord avec la littérature ; des études ont montré que la leptine et l'adiponectine étaient plus exprimées au niveau du CF qu'au niveau du TAM [363, 364, 369]. En parallèle, les travaux de l'équipe de Hans Herfarth (2006) notent clairement l'incidence des traitements thérapeutiques et plus particulièrement d'un traitement aux stéroïdes sur les taux d'expression des adipokines au niveau du CF. En effet, un traitement aux stéroïdes entraîne une diminution de l'expression de l'adiponectine et du VEGF et une augmentation de l'expression de la leptine et de l'IL-10 au niveau du CF en comparaison au CF issus de patients non traités aux

stéroïdes [364, 438, 439]. Malheureusement, n'ayant eu encore aucun accès à l'historique thérapeutique des patients inclus dans notre étude, nous ne pouvons pas exclure que les différences observées soient liées à des aspects thérapeutiques.

La nature non adipeuse du « CF-like » murin n'est pas comparable à celle observée dans le CF humain. En effet, le « CF-like » montre l'absence d'expression de leptine, d'adiponectine et de LHS, tandis que le CF humain montre seulement une expression amoindrie de ces marqueurs en comparaison avec le TAM. Toutefois, chez l'homme, les observations macroscopiques, montrent une différence phénotypique entre le CF, prélevé autour de la zone intestinale réséquée, et le TAM, prélevé à distance de cette zone ; son aspect morphologique est plus fibreux que celui du TAM. En accord avec ces observations, nos résultats préliminaires montrent une moindre digestion du CF en comparaison au TAM et au TA sous-cutané après digestion à la collagénase.

Les études histologiques et géniques ont également révélé la nature fibreuse du tissu « CF-like ». Tout comme le CF humain, le « CF-like » murin montre un infiltrat de cellules inflammatoires de type macrophagique et neutrophilaire important et se caractérise respectivement par une surexpression du marqueur F4/80 et des taux élevés de MPO [354, 369]. Le « CF-like » exprime également un taux élevé d'IL-6 et de MCP-1, en comparaison au TAM d'animaux contrôles. Ainsi le « CF-like » murin présente un profil inflammatoire et fibreux similaire à celui du CF humain.

Comme décrit précédemment dans l'inflammation du TAM, un recrutement de macrophages au niveau du CF est possible. Le « CF-like » exprime fortement la cytokine MCP-1, qui favorise un chimiotactisme des macrophages circulants au niveau de ce tissu. La MCP-1 est également capable d'entraîner une différenciation des adipocytes en pré-adipocytes [440]. Ces derniers sont caractérisés par l'expression du marqueur Pref-1 commun au lignage des fibroblastes [440]. De plus, les macrophages, via leurs sécrétions, peuvent orienter le phénotype des pré-adipocytes humains vers un phénotype pro-fibreux [441]. Ces différentes données suggèrent que la surexpression de MCP-1 au niveau du « CF-like » participerait à la mise en place de son profil fibreux. Cette hypothèse est en accord avec l'expression élevée des marqueurs F4/80 et Pref-1 retrouvée au niveau du « CF-like » dans le modèle DNBS.

De façon intéressante, des adipocytes cultivés au contact de cellules tumorales mammaires montrent une diminution de l'expression de LHS et une augmentation de l'expression des marqueurs fibreux et pro-inflammatoires tels que Pref-1, IL-6, TNF α et IL-1 β (données non publiées obtenues auprès du Dr C.Muller, CNRS, IPBS, Toulouse). Chez l'homme, les adipocytes au niveau du front d'invasion tumorale montrent, de façon similaire, une

surexpression de ces mêmes marqueurs inflammatoires (travaux non publiés). De plus, une diminution de la taille des adipocytes ainsi que leur proximité anatomo-fonctionnelle avec des fibroblastes sont observées [442]. L'ensemble de ces données suggère un gradient de différenciation adipocytaire en fonction de leur proximité avec la tumeur. L'ensemble de ces modifications sont similaires à celles retrouvées au niveau du « CF-like », suggérant que les zones inflammatoires de l'intestin pourraient engendrer une dédifférenciation du TAM situé à proximité de ces zones, pour aboutir à la formation de CF (Figure 33).

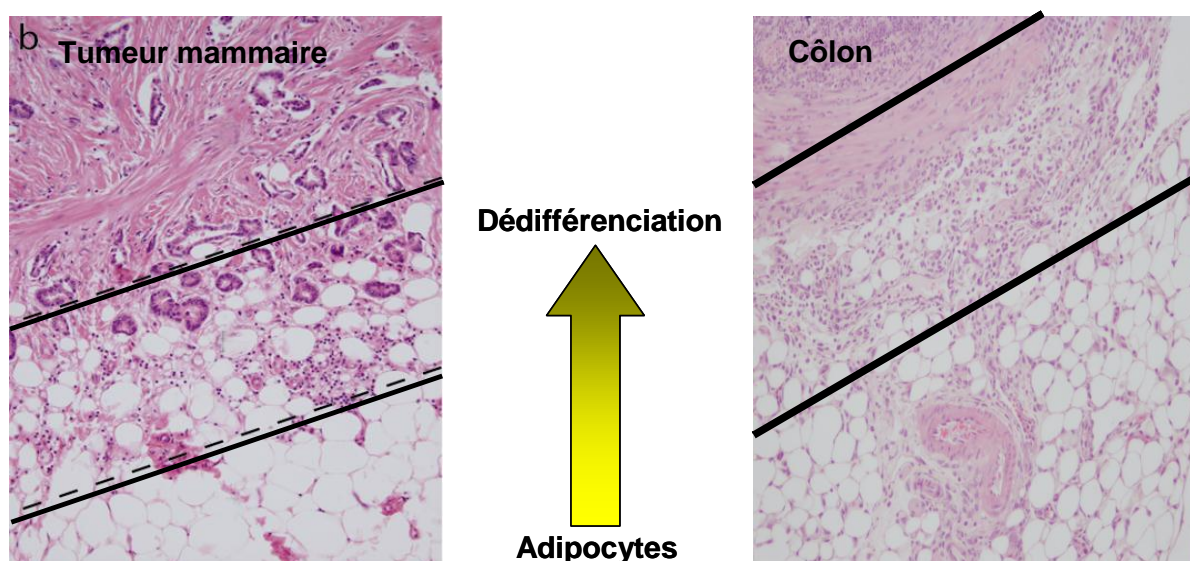


Figure 33. Comparaison entre le « CF-like » et le TA péri-tumoral dans le cancer du sein.

La tumeur mammaire [442], comme la zone nécrotique colique est entourée d'une masse grasse [411]. Le front d'invasion tumoral pourrait être comparé à la zone d'attache du CF au niveau du côlon montrant un même profil de dédifférenciation adipocytaire avec un infiltrat de cellules inflammatoires et de fibroblastes.

D'après la littérature, les premières études menées sur le CF, suggèrent que sa présence est liée à une inflammation intestinale trans pariétale présente dans la MC [354]. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les tissus lymphoïdes adjacents, par les infiltrats inflammatoires chroniques sous-jacents ou encore par les cellules épithéliales intestinales serait impliquée dans la formation du CF [353, 354]. Cependant la présence de CF peut être interprétée soit comme une conséquence soit comme un acteur de la pathologie. L'implication du CF comme acteur dans la pathogénèse de la MC et dans la réponse inflammatoire intestinale n'est discutée qu'à partir de 1999 [374]. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle du CF dans la physiopathologie de la MC.

IMPLICATION DU CF DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MC

La MC est caractérisée par une inflammation intestinale associée à une augmentation de la perméabilité intestinale [184]. Cette modification de la perméabilité intestinale s'explique par les modifications d'expression des protéines de jonctions serrées, mais également par l'altération de la paroi intestinale (nécrose, érosion, ulcération, apoptose) [244]. L'augmentation de perméabilité intestinale est définie comme un facteur prédictif du risque de rechute chez les patients en rémission [186]. La MC est également caractérisée par l'alternance de zones intestinales non inflammatoires et inflammatoires. Le CF est uniquement présent autour des zones inflammatoires de l'intestin [354]. Toutefois, il existe une proximité anatomique entre les zones non inflammatoires et inflammatoires de l'intestin gainées par le CF. Les rares études s'intéressant au rôle du CF dans la physiopathologie de la MC lui attribuent un rôle délétère dans le développement de la maladie. En effet, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, le CF participerait à la mise en place et/ou au maintien de l'inflammation, mais également au dysfonctionnement de la barrière intestinale au niveau local [350, 374]. Ainsi, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet des sécrétions du CF sur du tissu colique inflammatoire et non inflammatoire anatomiquement proches, chez la souris. Pour ce faire, nous avons confectionnés des milieux conditionnés de CF et de TA périgonadique (TAP : tissu contrôle), issus d'animaux ayant développés une inflammation colique « sévère » au DNBS. En parallèle, nous avons collecté des segments coliques provenant de souris préalablement soumises à une micro-inflammation colique par l'administration intracolique de DNBS (20mg/kg, 50% EtOH). Ce protocole nous a permis de distinguer chez ces souris, au niveau du côlon, deux zones distinctes *i.e* une zone non-inflammatoire (NI) et une zone micro-inflammatoire (MI). Les zones MI étaient caractérisées par une hyperémie de la muqueuse colique. Les segments coliques issus de ces deux zones ont été montés en chambre de Ussing et exposés du côté séreux aux milieux conditionnés de CF et de TAP.

Dans un premier temps, nous avons observés une augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire au FITC-Dextran des tissus coliques provenant de la zone MI en comparaison à la perméabilité intestinale paracellulaire des tissus coliques provenant de la zone NI. L'exposition aux milieux conditionnés de CF des segments coliques issus de la zone NI provoquent une augmentation de la perméabilité intestinale. Au contraire, leur exposition

aux milieux conditionnés de TAP ne modifie pas leur perméabilité intestinale paracellulaire. De la même manière, en condition basale, l'exposition de cellules coliques T84 aux milieux conditionnés de CF entraîne une diminution de l'expression de l'occludine (une protéine de jonctions serrées). Dans ces conditions, les sécrétions du CF auraient donc un effet délétère sur la fonction de barrière épithéliale intestinale des segments coliques NI. De manière surprenante, les milieux conditionnés de CF n'exacerbent pas la perméabilité paracellulaire des segments coliques MI. De la même façon, nos approches *in-vitro* montrent qu'une diminution de l'expression de l'occludine, induite par une exposition des cellules T84 à deux cytokines pro-inflammatoires que sont le TNF α et l'IFN γ , n'est pas exacerbée par l'ajout des milieux conditionnés de CF. En conditions inflammatoires, les sécrétions de CF n'exacerbent pas les modifications de la fonction de barrière intestinale observées au niveau des zones MI. Ainsi, nos résultats montrent un effet opposé des sécrétions de CF en fonction du statut inflammatoire des tissus. Le CF étant un tissu vascularisé [438], nous pouvons supposer que la communication entre les zones non inflammatoires situées à proximité du CF et les sécrétions de ce dernier s'effectue par voie systémique. Ces résultats nous amènent à proposer le schéma suivant (Figure 34).



Figure 34. Effet des sécrétions du CF en fonction du statut inflammatoire des tissus intestinaux.

Au cours de la MC, le CF se développe autour des zones intestinales inflammatoires, à proximité des zones non-inflammatoires (NI) de l'intestin. Les sécrétions du CF provoquent une augmentation de la perméabilité intestinale des zones NI et une diminution de l'occludine *in-vitro* en condition basale et participeraient à la mise en place de l'inflammation des zones NI présentes à proximité du CF.

Dans notre modèle, le « CF-like » est présent au moment du pic de l'inflammation et absent chez la totalité des animaux en cours de « rémission ». Cependant, une rémission totale nécessite une réparation tissulaire [418]. Sur ce postula, nous avons voulu déterminer si les sécrétions de CF pouvaient jouer un rôle dans la réparation de l'épithélium intestinal. Le processus de réparation comporte trois phases : une phase d'inflammation, une phase de formation et enfin une phase de remodelage du tissu [443]. Cette succession de phases est commune à un grand nombre de tissus : foie, peau, muscle...[444]. Au cours de la phase inflammatoire, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages sont recrutés sur le site de la blessure [445, 446]. Ces cellules aident à l'élimination des débris cellulaires et produisent des cytokines impliquées dans la régulation du processus de réparation. Durant la phase de formation tissulaire, les cellules épithéliales prolifèrent et migrent, de façon à recouvrir la zone lésée [402, 418]. Les fibroblastes participent également à ce phénomène de réparation. De façon concomitante, un processus d'angiogénèse se met en place [444]. La phase de remodelage consiste à réorganiser l'ensemble des tissus conjonctifs. Nos études *in vitro*, ont montré que les milieux conditionnés de CF augmentent la capacité proliférative, migratoire et la capacité de réparation des cellules coliques T84 en culture. Ces résultats suggèrent que le CF, via ses sécrétions, participerait à la réparation tissulaire intestinale.

L'importance des macrophages dans le processus de réparation tissulaire est clairement établie [101]. En effet, aussi bien chez le porc [447] que chez le rongeur, la déplétion en monocytes circulants entraîne un défaut de réparation cutanée [423, 445]. Les monocytes pro-inflammatoires recrutés au niveau de la blessure vont, après phagocytose des débris cellulaires, modifier leur profil en monocytes anti-inflammatoires. Ils vont ensuite proliférer et se différencier en macrophages et plus particulièrement en « Wound macrophages », nécessaires à la phase de formation tissulaire [445]. Lors d'une blessure cutanée, l'absence de macrophages est associée à une diminution de la prolifération cellulaire, de l'angiogénèse et de l'expression, au niveau du site de la blessure, de TGF β et de VEGF deux médiateurs sécrétés par les macrophages et impliqués dans la réparation [448]. Chez l'homme, il a été montré que le CF sécrète du VEGF, mais le type cellulaire responsable de cette sécrétion n'a pas été identifié [438]. Les données que nous avons obtenues montrent un infiltrat de macrophages dans le « CF-like ». L'ensemble de ces données suggère une participation des macrophages du CF dans la réparation de la paroi intestinale aussi bien chez l'homme que dans notre modèle via la sécrétion par ce tissu de médiateurs comme le VEGF. Pour confirmer cette hypothèse une caractérisation précise des macrophages présents dans le

CF et le « CF-like » doit être effectuée à l'aide de différents marqueurs phénotypiques spécifiques des « wound macrophages » tels que le CCL17, CCL18, CCL20, chemokines impliquées dans le chimiotactisme des monocytes, des macrophages et des cellules T.

Parmi les médiateurs impliqués dans le processus de réparation, l'IL-6 est actuellement étudiée [421, 449]. Des études de blessures cutanées et hépatiques ont montré son importance dans la régénération de ces tissus [450, 451]. De façon intéressante, la capacité des milieux conditionnés de CF à stimuler la migration cellulaire est positivement corrélée à leur concentration en IL-6, suggérant son implication dans le processus de migration cellulaire. Le rôle de l'IL-6 doit être interprété en fonction de la présence ou non de la forme soluble de son récepteur (sIL-6R). En effet, suivant les conditions physiopathologiques la liaison de l'IL-6 à sIL-6R entraîne des effets opposés. Par exemple, en cas d'inflammation aiguë, la liaison de l'IL-6 à sIL-6R diminue l'inflammation péritonéale [452]. A l'inverse, lors d'une inflammation chronique comme lors de la MC, les taux circulants d'IL-6 et de sIL-6R sont augmentés, et participent au maintien de l'inflammation [453, 454]. Aussi, afin de vérifier l'implication de l'IL-6 et de son récepteur soluble contenus dans les milieux conditionnés de CF, des études sont actuellement en cours au laboratoire sur des cellules coliques T84 en culture.

L'implication potentielle des sécrétions du CF, dans l'induction de l'expression de la $\beta 2$ défensine (HBD-2) par les cellules épithéliales intestinales a été entreprise. La voie responsable de l'induction de l'expression de HBD-2 implique la stimulation du récepteur NOD2 qui activerait secondairement la voie de signalisation intracellulaire NF κ B [160]. L'expression basale de HBD-2 dans un épithélium colique sain est faible [455]. En revanche, son expression est significativement augmentée dans un épithélium colique inflammatoire [455]. En plus de son rôle antimicrobien, l'HBD-2 est également impliquée dans la réparation tissulaire intestinale in vitro [456, 457]. En effet l'HBD-2 participe à la réparation d'un tapis cellulaire de cellules épithéliales coliques (T84, CaCo2, HT-29, IEC6) après blessure [456, 457]. Cet effet serait médié par l'activation des récepteurs CCR6 par HBD-2 [457]. De plus, HBD-2 entraîne à la fois une diminution de l'apoptose des cellules épithéliales intestinale et une augmentation de la sécrétion de Muc2, mucine impliquée dans la protection de la muqueuse intestinale [456]. Des études montrent une moindre expression de l'HBD-2 sur des biopsies coliques issues de patients souffrant de MC en comparaison aux biopsies issues de patients souffrant de RCH [163]. Cette moindre expression de la HBD-2 dans la MC pourrait

être associée à la mutation du gène NOD2 ; mutation retrouvée chez 50% des patients souffrant de MC [11]. L'ensemble de ces données, associé à nos résultats montrant que les sécrétions de CF stimulent le mécanisme de réparation tissulaire, nous permettent de suggérer l'induction de l'expression et de la sécrétion de HBD-2 par les cellules épithéliales, en réponse aux milieux conditionnés de CF. Toutefois, cette action réparatrice concernerait les patients atteints de MC ne présentant pas de mutation NOD2.

Afin de confirmer cette hypothèse, dans des travaux en cours, nous réalisons le dosage d'HBD-2 dans les milieux de culture des cellules T84 préalablement soumises à une blessure et exposées ou non à des milieux conditionnés de CF.

En conclusion, la mise en place d'un modèle murin de CF-like nous a permis de mettre en évidence la dualité de l'implication du CF et plus particulièrement de ses sécrétions sur l'intégrité de la barrière intestinale. Le CF pourrait être considéré comme un tissu à double facette : inducteur ou protecteur de l'inflammation suivant le statut inflammatoire des tissus. Il apparaîtrait « délétère » au niveau de la perméabilité intestinale sur les tissus non inflammatoires et aurait un rôle « bénéfique » dans la réparation tissulaire intestinale.

L'objectif de ce travail de thèse était d'élargir les connaissances sur le rôle du tissu adipeux mésentérique et du creeping-fat dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. Grâce à la mise au point d'un modèle expérimental murin, permettant le développement d'un tissu « CF-like », nos travaux ont contribué à caractériser pour la première fois ce tissu. Nous avons dans un deuxième temps étudié son rôle dans la physiopathologie de la colite. Nous nous sommes également intéressés à étudier les modifications géniques du tissu adipeux mésentérique dans des conditions d'inflammation colique modérée et sévère. Lors la discussion nous avons évoqué différents travaux entrepris à court terme nécessaires à la compréhension des communications bidirectionnelles entre le tissu adipeux viscéral et l'inflammation intestinale présentes dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

PARTIE 4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
2. Pang, Y.H., et al., *Increased expression and activation of IL-12-induced Stat4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients*. Cell Immunol, 2007. **248**(2): p. 115-20.
3. Koutroubakis, I., et al., *Environmental risk factors in inflammatory bowel disease*. Hepatogastroenterology, 1996. **43**(8): p. 381-93.
4. Cooney, R. and D. Jewell, *The genetic basis of inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 428-42.
5. Parkes, M. and D. Jewell, *Ulcerative colitis and Crohns disease: molecular genetics and clinical implications*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-18.
6. Hugot, J.P., et al., *Linkage analyses of chromosome 6 loci, including HLA, in familial aggregations of Crohn disease*. G.E.T.A.I.D. Am J Med Genet, 1994. **52**(2): p. 207-13.
7. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
8. Gutierrez, O., et al., *Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41701-5.
9. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. Gut, 2003. **52**(6): p. 840-6.
10. Hugot, J.P., et al., *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16*. Nature, 1996. **379**(6568): p. 821-3.
11. Lesage, S., et al., *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 845-57.
12. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e58.
13. Einarsdottir, E., et al., *IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 8.
14. Lin, Z., et al., *Genetic association of nonsynonymous variants of the IL23R with familial and sporadic inflammatory bowel disease in women*. Dig Dis Sci, 2010. **55**(3): p. 739-46.
15. Halfvarson, J., et al., *Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(12): p. 1536-44.
16. Halme, L., et al., *Family and twin studies in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3668-72.
17. Armitage, E.L., et al., *Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence*. Gastroenterology, 2004. **127**(4): p. 1051-7.
18. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. Gut, 1996. **39**(5): p. 690-7.
19. Ghosh, S., D. van Heel, and R.J. Playford, *Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation?* Gut, 2004. **53**(5): p. 620-2.
20. Binder, V., *Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(3): p. 463-79.

21. Lakatos, P.L., T. Szamosi, and L. Lakatos, *Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly?* World J Gastroenterol, 2007. **13**(46): p. 6134-9.
22. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54.
23. Traue, H.C. and P. Kosarz, *Everyday stress and Crohn's disease activity: a time series analysis of 20 single cases.* Int J Behav Med, 1999. **6**(2): p. 101-19.
24. Mardini, H.E., K.E. Kip, and J.W. Wilson, *Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity.* Dig Dis Sci, 2004. **49**(3): p. 492-7.
25. Lerebours, E., et al., *Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(1): p. 122-31.
26. Mackner, L.M., D.P. Sisson, and W.V. Crandall, *Review: psychosocial issues in pediatric inflammatory bowel disease.* J Pediatr Psychol, 2004. **29**(4): p. 243-57.
27. Van Kruiningen, H.J., et al., *Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(4): p. 360-5.
28. Pardi, D.S., et al., *Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(6): p. 1480-5.
29. Ekbom, A., et al., *Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease.* Lancet, 1994. **344**(8921): p. 508-10.
30. Ekbom, A., et al., *Crohn's disease after in-utero measles virus exposure.* Lancet, 1996. **348**(9026): p. 515-7.
31. Greenstein, R.J. and M.T. Collins, *Emerging pathogens: is Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis zoonotic?* Lancet, 2004. **364**(9432): p. 396-7.
32. Naser, S.A., et al., *Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease.* Lancet, 2004. **364**(9439): p. 1039-44.
33. Bull, T.J., et al., *Detection and verification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 2915-23.
34. Millar, D., et al., *IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales.* Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(9): p. 3446-52.
35. Naser, S.A., D. Schwartz, and I. Shafran, *Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(4): p. 1094-5.
36. Mishina, D., et al., *On the etiology of Crohn disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9816-20.
37. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.* Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
38. Danese, S., et al., *Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2005. **11**(46): p. 7227-36.
39. Evans, P.E. and D.S. Pardi, *Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: focus on the musculoskeletal, dermatologic, and ocular manifestations.* MedGenMed, 2007. **9**(1): p. 55.
40. Sano, H., et al., *Clinical characteristics of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis.* J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010.
41. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease.* N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
42. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.

43. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. Gut, 2001. **48**(4): p. 526-35.
44. Bossuyt, X., *Serologic markers in inflammatory bowel disease*. Clin Chem, 2006. **52**(2): p. 171-81.
45. Bitton, A., et al., *Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2001. **120**(1): p. 13-20.
46. McClane, S.J. and J.L. Rombeau, *Cytokines and inflammatory bowel disease: a review*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(5 Suppl): p. S20-4.
47. Sutherland, L., et al., *Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease*. Gut, 1991. **32**(9): p. 1071-5.
48. Turunen, U.M., et al., *Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study*. Gastroenterology, 1998. **115**(5): p. 1072-8.
49. Newton, R., *Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?* Thorax, 2000. **55**(7): p. 603-13.
50. Johansson, M., et al., *New aspects concerning ulcerative colitis and colonic carcinoma: analysis of levels of neuropeptides, neurotrophins, and TNFalpha/TNF receptor in plasma and mucosa in parallel with histological evaluation of the intestine*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(10): p. 1331-40.
51. Andoh, A., et al., *Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(33): p. 5154-61.
52. Danese, S., *Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker*. Dig Liver Dis, 2008. **40 Suppl 2**: p. S225-8.
53. Caviglia, R., I. Boskoski, and M. Cicala, *Long-term treatment with infliximab in inflammatory bowel disease: safety and tolerability issues*. Expert Opin Drug Saf, 2008. **7**(5): p. 617-32.
54. Hanauer, S.B. and D.H. Present, *The state of the art in the management of inflammatory bowel disease*. Rev Gastroenterol Disord, 2003. **3**(2): p. 81-92.
55. Floch, M.H., *Probiotics, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Disease*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2003. **6**(4): p. 283-288.
56. Bibiloni, R., et al., *VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(7): p. 1539-46.
57. Borody, T.J., et al., *Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy*. J Clin Gastroenterol, 2003. **37**(1): p. 42-7.
58. Prantera, C., et al., *Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG*. Gut, 2002. **51**(3): p. 405-9.
59. Guslandi, M., P. Giollo, and P.A. Testoni, *A pilot trial of Saccharomyces boulardii in ulcerative colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003. **15**(6): p. 697-8.
60. Schultz, M. and A.L. Lindstrom, *Rationale for probiotic treatment strategies in inflammatory bowel disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008. **2**(3): p. 337-55.
61. Segain, J.P., et al., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
62. Galvez, J., M.E. Rodriguez-Cabezas, and A. Zarzuelo, *Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(6): p. 601-8.
63. Tedelind, S., et al., *Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(20): p. 2826-32.
64. Bach, S.P. and N.J. Mortensen, *Ileal pouch surgery for ulcerative colitis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(24): p. 3288-300.

65. Berrebi, D., et al., *Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 667-72.
66. Monteleone, G., et al., *Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1169-78.
67. Mattner, F., et al., *The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2202-8.
68. Schmidt, C., et al., *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 16-23.
69. Mannon, P.J., et al., *Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease*. N Engl J Med, 2004. **351**(20): p. 2069-79.
70. Sandborn, W.J., et al., *A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease*. Gastroenterology, 2008. **135**(4): p. 1130-41.
71. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1310-6.
72. Ito, H., et al., *A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 989-96; discussion 947.
73. Hueber, W., et al., *Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis*. Sci Transl Med, 2010. **2**(52): p. 52ra72.
74. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
75. Schreiber, S., et al., *Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease*. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1461-72.
76. Fedorak, R.N., et al., *Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease*. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1473-82.
77. Drakos, P.E., A. Nagler, and R. Or, *Case of Crohn's disease in bone marrow transplantation*. Am J Hematol, 1993. **43**(2): p. 157-8.
78. Oyama, Y., et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 552-63.
79. Garcia-Olmo, D., et al., *A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(7): p. 1416-23.
80. Wei, Y., et al., *Comparison of the population capacity of hematopoietic and mesenchymal stem cells in experimental colitis rat model*. Transplantation, 2009. **88**(1): p. 42-8.
81. Ando, Y., et al., *Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 826-38.
82. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
83. Michelsen, K.S. and M. Arditi, *Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(1): p. 48-54.

84. Kanzler, H., et al., *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 552-9.
85. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
86. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
87. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
88. Izadpanah, A. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides*. J Am Acad Dermatol, 2005. **52**(3 Pt 1): p. 381-90; quiz 391-2.
89. Pazgier, M., et al., *Human beta-defensins*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(11): p. 1294-313.
90. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
91. Sorensen, O.E., et al., *Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4870-9.
92. Yang, D., et al., *Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6*. Science, 1999. **286**(5439): p. 525-8.
93. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
94. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
95. Jensen, P.E., *Recent advances in antigen processing and presentation*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1041-8.
96. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
97. Coombes, J.L. and F. Powrie, *Dendritic cells in intestinal immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 435-46.
98. Fleeton, M., et al., *Involvement of dendritic cell subsets in the induction of oral tolerance and immunity*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1029**: p. 60-5.
99. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
100. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
101. Daley, J.M., et al., *The phenotype of murine wound macrophages*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 59-67.
102. Rodriguez-Pinto, D., *B cells as antigen presenting cells*. Cell Immunol, 2005. **238**(2): p. 67-75.
103. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
104. Romagnani, S., *Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease*. Int J Clin Lab Res, 1991. **21**(2): p. 152-8.
105. Pulendran, B., *Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2457-65.
106. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
107. Tato, C.M. and J.J. O'Shea, *Immunology: what does it mean to be just 17?* Nature, 2006. **441**(7090): p. 166-8.
108. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
109. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.

110. McGhee, J.R., *The world of TH1/TH2 subsets: first proof*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 3-4.
111. Romagnani, S., *Biology of human TH1 and TH2 cells*. J Clin Immunol, 1995. **15**(3): p. 121-9.
112. Romagnani, S., *Th1/Th2 cells*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 285-94.
113. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
114. Iwakura, Y., et al., *The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 57-79.
115. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
116. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 337-48.
117. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
118. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 652-7.
119. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
120. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
121. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
122. Ramsdell, F., *Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?* Immunity, 2003. **19**(2): p. 165-8.
123. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
124. Hubert, P., et al., *The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil?* J Leukoc Biol, 2007. **82**(4): p. 781-94.
125. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 610-21.
126. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 801-5.
127. Maloy, K.J., et al., *CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 111-9.
128. Cooke, A., *Th17 cells in inflammatory conditions*. Rev Diabet Stud, 2006. **3**(2): p. 72-5.
129. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
130. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
131. Salim, S.Y. and J.D. Soderholm, *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011.
132. Nieuwenhuijs, V.B., et al., *The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats*. Ann Surg, 1998. **228**(2): p. 188-93.
133. Pardo, A., et al., *Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 858-63.

134. Simon, G.L. and S.L. Gorbach, *Intestinal flora in health and disease*. Gastroenterology, 1984. **86**(1): p. 174-93.
135. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-9.
136. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
137. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
138. Bandeira, A., et al., *Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization*. J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 239-44.
139. Nicaise, P., et al., *Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages*. Eur Cytokine Netw, 1993. **4**(2): p. 133-8.
140. Nicaise, P., et al., *The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(3): p. 365-72.
141. Strauch, U.G., et al., *Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis*. Gut, 2005. **54**(11): p. 1546-52.
142. Umesaki, Y. and H. Setoyama, *Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model*. Microbes Infect, 2000. **2**(11): p. 1343-51.
143. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
144. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(8): p. 1131-40.
145. Kleessen, B., et al., *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(9): p. 1034-41.
146. Sokol, H., et al., *Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 858-67.
147. Tamboli, C.P., et al., *Dysbiosis as a prerequisite for IBD*. Gut, 2004. **53**(7): p. 1057.
148. Seksik, P., et al., *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon*. Gut, 2003. **52**(2): p. 237-42.
149. Suau, A., et al., *Fusobacterium prausnitzii and related species represent a dominant group within the human fecal flora*. Syst Appl Microbiol, 2001. **24**(1): p. 139-45.
150. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16731-6.
151. Crosnier, C., D. Stamataki, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
152. Ouellette, A.J. and C.L. Bevins, *Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(1): p. 43-50.
153. Chung, W.O. and B.A. Dale, *Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 352-8.
154. Wehkamp, J., et al., *Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(4): p. 460-5.

155. Fellermann, K., et al., *A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 439-48.
156. Wehkamp, J., M. Schmid, and E.F. Stange, *Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(4): p. 370-8.
157. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
158. Ogura, Y., et al., *Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis*. Gut, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
159. Lala, S., et al., *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 47-57.
160. Voss, E., et al., *NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2005-11.
161. Simms, L.A., et al., *Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease*. Gut, 2008. **57**(7): p. 903-10.
162. Wehkamp, J., et al., *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(4): p. 215-23.
163. Wehkamp, J., et al., *Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(7): p. 745-52.
164. Johansson, M.E., K.A. Thomsson, and G.C. Hansson, *Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein*. J Proteome Res, 2009. **8**(7): p. 3549-57.
165. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G922-9.
166. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
167. McGuckin, M.A., et al., *Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 100-13.
168. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
169. Velcich, A., et al., *Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1726-9.
170. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
171. Dvorak, A.M., et al., *Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system*. Hum Pathol, 1980. **11**(6): p. 620-34.
172. Trabucchi, E., et al., *Differential diagnosis of Crohn's disease of the colon from ulcerative colitis: ultrastructure study with the scanning electron microscope*. Int J Tissue React, 1986. **8**(1): p. 79-84.
173. Van Klinken, B.J., et al., *Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis*. Gut, 1999. **44**(3): p. 387-93.
174. Tytgat, K.M., et al., *Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(2): p. 397-405.

175. Schultsz, C., et al., *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(5): p. 1089-97.
176. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(1): p. G7-G13.
177. Lal-Nag, M. and P.J. Morin, *The claudins*. *Genome Biol*, 2009. **10**(8): p. 235.
178. Chiba, H., et al., *Transmembrane proteins of tight junctions*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 588-600.
179. Sakakibara, A., et al., *Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation*. *J Cell Biol*, 1997. **137**(6): p. 1393-401.
180. Schulzke, J.D., et al., *Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1669**(1): p. 34-42.
181. Van Itallie, C.M., et al., *Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(16): p. 2844-2852.
182. Arrate, M.P., et al., *Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 45826-32.
183. Rajasekaran, A.K., et al., *Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(3): p. 451-63.
184. Hollander, D., et al., *Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor*. *Ann Intern Med*, 1986. **105**(6): p. 883-5.
185. May, G.R., L.R. Sutherland, and J.B. Meddings, *Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease?* *Gastroenterology*, 1993. **104**(6): p. 1627-32.
186. Arnott, I.D., K. Kingstone, and S. Ghosh, *Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(11): p. 1163-9.
187. Wyatt, J., et al., *Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease*. *Lancet*, 1993. **341**(8858): p. 1437-9.
188. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
189. Oshima, T., H. Miwa, and T. Joh, *Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23 Suppl 2**: p. S146-50.
190. Prasad, S., et al., *Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells*. *Lab Invest*, 2005. **85**(9): p. 1139-62.
191. Vetrano, S., et al., *Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 173-84.
192. Laukoetter, M.G., P. Nava, and A. Nusrat, *Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(3): p. 401-7.
193. Katz, K.D., et al., *Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 927-31.
194. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 342-7.
195. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. *Br J Nutr*, 1998. **80 Suppl 1**: p. S147-71.
196. Spahn, T.W. and T. Kucharzik, *Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 456-65.

197. Pabst, O., et al., *Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes*. Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 98-107.
198. Barreau, F., et al., *Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches*. Gut, 2010. **59**(2): p. 207-17.
199. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
200. Ardizzone, S. and G. Bianchi Porro, *Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment*. J Intern Med, 2002. **252**(6): p. 475-96.
201. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
202. Bamias, G., et al., *The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease*. Curr Opin Investig Drugs, 2003. **4**(11): p. 1279-86.
203. Niess, J.H., *Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(33): p. 5138-48.
204. Targan, S.R. and L.C. Karp, *Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 296-305.
205. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
206. Andoh, A., et al., *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 969-84.
207. Monteleone, G., et al., *Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 687-94.
208. Takahashi, M., et al., *An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(4): p. 677-86.
209. Makita, S., et al., *CD4⁺CD25^{bright} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3119-30.
210. Maul, J., et al., *Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^(high) T cells in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1868-78.
211. Yu, Q.T., et al., *Expression and functional characterization of FOXP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(2): p. 191-9.
212. Madara, J.L. and J. Stafford, *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 724-7.
213. Ma, T.Y., et al., *Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(3): p. G422-30.
214. Wang, F., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 409-19.
215. Blair, S.A., et al., *Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease*. Lab Invest, 2006. **86**(2): p. 191-201.
216. Ivanov, A.I., A. Nusrat, and C.A. Parkos, *Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(1): p. 176-88.

217. Utech, M., et al., *Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 5040-52.
218. Suenart, P., et al., *Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(8): p. 2000-4.
219. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 495-549.
220. Westbrook, A.M., A. Szakmary, and R.H. Schiestl, *Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models*. Mutat Res, 2010. **705**(1): p. 40-59.
221. Brandwein, S.L., et al., *Spontaneously colitic C3H/HeJBir mice demonstrate selective antibody reactivity to antigens of the enteric bacterial flora*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 44-52.
222. Sugawara, K., et al., *Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in SAMP1/YitFc mice and in human Crohn's disease*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 351-60.
223. Matsumoto, S., et al., *Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain*. Gut, 1998. **43**(1): p. 71-8.
224. Sadlack, B., et al., *Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene*. Cell, 1993. **75**(2): p. 253-61.
225. Hibi, T., H. Ogata, and A. Sakuraba, *Animal models of inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2002. **37**(6): p. 409-17.
226. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
227. Spencer, D.M., et al., *Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 94-105.
228. Berg, D.J., et al., *Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 1010-20.
229. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 39-49.
230. Welte, T., et al., *STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1879-84.
231. Renes, I.B., et al., *Alterations in Muc2 biosynthesis and secretion during dextran sulfate sodium-induced colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(2): p. G382-9.
232. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. Lab Invest, 1993. **69**(2): p. 238-49.
233. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
234. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
235. Alex, P., et al., *Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(3): p. 341-52.
236. Fuss, I.J., et al., *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1261-70.

237. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12238.
238. Williams, K.L., et al., *Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone*. Gastroenterology, 2001. **120**(4): p. 925-37.
239. Cooper, H.S., et al., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation*. Carcinogenesis, 2000. **21**(4): p. 757-68.
240. Boirivant, M., et al., *Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1929-39.
241. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
242. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
243. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
244. Qiu, B.S., et al., *The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1178-82.
245. Schulzke, J.D. and M. Fromm, *Tight junctions: molecular structure meets function*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1165**: p. 1-6.
246. Schulzke, J.D., et al., *Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 288-99.
247. Hering, N.A. and J.D. Schulzke, *Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 450-4.
248. Mennigen, R., et al., *Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(5): p. G1140-9.
249. Zeissig, S., et al., *Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment*. Gut, 2004. **53**(9): p. 1295-302.
250. Zwiers, A., et al., *Increased expression of the tight junction molecule claudin-18 A1 in both experimental colitis and ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(12): p. 1652-9.
251. Krinsky, M., et al., *Amelioration of TNBS-induced colon inflammation in rats by phospholipase A2 inhibitor*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G586-92.
252. Uronis, J.M., et al., *Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 289-97.
253. Mohamed-Ali, V., J.H. Pinkney, and S.W. Coppack, *Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1998. **22**(12): p. 1145-58.
254. Fruhbeck, G., *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. Methods Mol Biol, 2008. **456**: p. 1-22.
255. Rodbell, M., *Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 375-80.
256. Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E827-47.

257. Avram, A.S., M.M. Avram, and W.D. James, *Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(4): p. 671-83.
258. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 9-15.
259. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
260. Blouin, C., E. Hajduch, and I. Dugail, *[A new look at adipocyte lipid droplets: towards a role in the sensing of triacylglycerol stores?]*. J Soc Biol, 2006. **200**(1): p. 59-65.
261. Faust, J., et al., *Human fetal cells. I. Mitogenic responses*. Z Immunitätsforsch Immunobiol, 1978. **155**(2): p. 93-103.
262. Lemonnier, D., *Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet*. J Clin Invest, 1972. **51**(11): p. 2907-15.
263. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
264. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*. Cell, 1993. **73**(4): p. 725-34.
265. Sengenès, C., et al., *Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells*. J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 114-22.
266. Charrière, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
267. Curat, C.A., et al., *From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1285-92.
268. Miranville, A., et al., *Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 349-55.
269. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin*. Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 744-7.
270. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
271. Cancello, R., et al., *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2277-86.
272. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
273. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
274. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1116-20.
275. Hevener, A.L., et al., *Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1658-69.
276. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 16-23.
277. Bjorntorp, P., *Sjostrom L, +SJOSTROM L: Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity*. Metabolism, 1971. **20**(7): p. 703-13.

278. Halvorsen, Y.D., et al., *Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells*. Tissue Eng, 2001. **7**(6): p. 729-41.
279. Erickson, G.R., et al., *Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(2): p. 763-9.
280. Rodriguez, L.V., et al., *Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12167-72.
281. Bjorntorp, P., et al., *Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes*. J Lipid Res, 1978. **19**(3): p. 316-24.
282. Rodriguez, A.M., et al., *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 125-8.
283. Bowers, R.R., et al., *Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(6): p. R1167-75.
284. Penicaud, L., et al., *The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 903-8.
285. Wilson, S., et al., *Agonist potency at the cloned human beta-3 adrenoceptor depends on receptor expression level and nature of assay*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **279**(1): p. 214-21.
286. Weyer, C., et al., *Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans*. Diabetes, 1998. **47**(10): p. 1555-61.
287. Lafontan, M. and M. Berlan, *Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(6): p. 276-83.
288. Vague, J., *Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity*. 1947. Obes Res, 1996. **4**(2): p. 201-3.
289. Fredrikson, G., et al., *Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties*. J Biol Chem, 1981. **256**(12): p. 6311-20.
290. Rodbell, M., *Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 753-5.
291. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
292. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 347-55.
293. Juge-Aubry, C.E., E. Henrichot, and C.A. Meier, *Adipose tissue: a regulator of inflammation*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 547-66.
294. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. **14**(3): p. 141-8.
295. Bjorbaek, C. and B.B. Kahn, *Leptin signaling in the central nervous system and the periphery*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 305-31.
296. Kakuma, T., et al., *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8536-41.
297. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
298. MacDougald, O.A., et al., *Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9034-7.

299. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
300. Wang, J., et al., *A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 684-8.
301. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
302. Sitaraman, S., et al., *Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 696-8.
303. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
304. Maeda, N., et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 731-7.
305. Yamauchi, T., et al., *Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2461-8.
306. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* Diabetes Care, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
307. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
308. Lafontan, M. and N. Viguerie, *Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(6): p. 580-5.
309. Kumada, M., et al., *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 85-9.
310. Garaulet, M., et al., *Adiponectin gene expression and plasma values in obese women during very-low-calorie diet. Relationship with cardiovascular risk factors and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 756-60.
311. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
312. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
313. Hotamisligil, G.S., *The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance*. J Intern Med, 1999. **245**(6): p. 621-5.
314. Fain, J.N., *Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells*. Vitam Horm, 2006. **74**: p. 443-77.
315. Christiansen, T., B. Richelsen, and J.M. Bruun, *Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(1): p. 146-50.
316. Henrichot, E., et al., *Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2594-9.
317. Meier, C.A. and S. Thalmann, *[White adipose tissue, inflammation and atherosclerosis]*. Bull Acad Natl Med, 2007. **191**(4-5): p. 897-908; discussion 908-10.
318. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
319. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 773-8.

320. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. Diabetologia, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
321. Festa, A., et al., *Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 42-7.
322. Nieman, D.C., et al., *Influence of obesity on immune function*. J Am Diet Assoc, 1999. **99**(3): p. 294-9.
323. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
324. Papathanassoglou, E., et al., *Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7745-52.
325. Hick, R.W., et al., *Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 169-76.
326. Howard, J.K., et al., *Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1051-9.
327. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
328. Siegmund, B., et al., *Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 552-60.
329. Zhao, Y., et al., *Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(2): p. 247-52.
330. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.
331. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
332. Kern, P.A., et al., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1779-85.
333. Bruun, J.M., et al., *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(3): p. E527-33.
334. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
335. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
336. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
337. Cousin, B., et al., *A role for preadipocytes as macrophage-like cells*. FASEB J, 1999. **13**(2): p. 305-12.
338. Saillan-Barreau, C., et al., *Human adipose cells as candidates in defense and tissue remodeling phenomena*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(3): p. 502-5.
339. Kopp, A., et al., *Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(4): p. 648-56.

340. Chung, S., et al., *Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes*. Endocrinology, 2006. **147**(11): p. 5340-51.
341. Poulain-Godefroy, O. and P. Froguel, *Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 662-7.
342. Anderson, P.D., et al., *Innate immunity modulates adipokines in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2272-9.
343. Song, M.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 739-45.
344. Schaffler, A., J. Scholmerich, and B. Salzberger, *Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs*. Trends Immunol, 2007. **28**(9): p. 393-9.
345. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 932-7.
346. Leuwer, M., et al., *Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice*. Pflugers Arch, 2009. **457**(4): p. 731-41.
347. Suganami, T., J. Nishida, and Y. Ogawa, *A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2062-8.
348. Suganami, T., et al., *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 84-91.
349. Suganami, T., et al., *Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(1): p. 45-9.
350. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. **56**(4): p. 577-83.
351. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Regional ileitis; a pathologic and clinical entity*. Am J Med, 1952. **13**(5): p. 583-90.
352. Bertin, B., P. Desreumaux, and L. Dubuquoy, *Obesity, visceral fat and Crohn's disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(5): p. 574-80.
353. Smedh, K., et al., *Intraoperative enteroscopy in Crohn's disease*. Br J Surg, 1993. **80**(7): p. 897-900.
354. Sheehan, A.L., et al., *Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice*. Br J Surg, 1992. **79**(9): p. 955-8.
355. Parmentier-Decrucq, E., et al., *Effects of infliximab therapy on abdominal fat and metabolic profile in patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(10): p. 1476-84.
356. Borley, N.R., et al., *The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link*. J Pathol, 2000. **190**(2): p. 196-202.
357. Hoppin, A.G., et al., *Serum leptin in children and young adults with inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1998. **26**(5): p. 500-5.
358. Nishi, Y., et al., *Plasma leptin and ghrelin concentrations in patients with Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(46): p. 7314-7.
359. Valentini, L., et al., *Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease*. Nutrition, 2009. **25**(2): p. 172-81.

360. Karmiris, K., et al., *Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(2): p. 100-5.
361. Karmiris, K., et al., *The effect of infliximab on circulating levels of leptin, adiponectin and resistin in patients with inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007. **19**(9): p. 789-94.
362. Franchimont, D., et al., *Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3510-6.
363. Barbier, M., et al., *Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterol Clin Biol, 2003. **27**(11): p. 987-91.
364. Paul, G., et al., *Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(6): p. 471-7.
365. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-25.
366. Sennello, J.A., et al., *Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice*. Cytokine, 2006. **36**(5-6): p. 261-6.
367. Barbier, M., et al., *Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats*. Gut, 1998. **43**(6): p. 783-90.
368. Gambero, A., et al., *Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(11): p. 1357-64.
369. Yamamoto, K., et al., *Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(6): p. 789-96.
370. Fayad, R., et al., *Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 601-14.
371. Nishihara, T., et al., *Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 853-61.
372. Kohut, M., M. Hartleb, and T. Hartleb, *[Significance of serum concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in identification of patients with Crohn's disease]*. Pol Merkur Lekarski, 2010. **29**(171): p. 169-72.
373. Nancey, S., et al., *Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity*. Dig Dis Sci, 2008. **53**(1): p. 242-7.
374. Desreumaux, P., et al., *Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(1): p. 73-81.
375. Karagiannides, I., et al., *Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5207-12.
376. Koon, H.W., et al., *Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8766-71.
377. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 260-76.
378. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
379. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease*. Int J Colorectal Dis, 2000. **15**(3): p. 144-60.
380. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 329-39.

381. Wallace, J.L., et al., *Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy*. Gastroenterology, 1992. **102**(4 Pt 1): p. 1176-85.
382. Olivier, I., et al., *Is Crohn's creeping fat an adipose tissue?* Inflamm Bowel Dis.
383. Melgar, S., et al., *Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G165-72.
384. Mattacks, C.A., D. Sadler, and C.M. Pond, *The cellular structure and lipid/protein composition of adipose tissue surrounding chronically stimulated lymph nodes in rats*. J Anat, 2003. **202**(6): p. 551-61.
385. Fasshauer, M., et al., *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **301**(4): p. 1045-1050.
386. Wong, S. and J. Pinkney, *Role of cytokines in regulating feeding behaviour*. Curr Drug Targets, 2004. **5**(3): p. 251-63.
387. Yu, R., et al., *Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(8): p. 1353-62.
388. de Oliveira, C.C., et al., *Depot-specific alterations to insulin signaling in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammatory response*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(4): p. 396-402.
389. Thomaz, M.A., et al., *Methotrexate is effective in reactivated colitis and reduces inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammation*. Pharmacol Res, 2009. **60**(4): p. 341-6.
390. Bjarnason, I., A. MacPherson, and D. Hollander, *Intestinal permeability: an overview*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1566-81.
391. Ukabam, S.O., J.R. Clamp, and B.T. Cooper, *Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon*. Digestion, 1983. **27**(2): p. 70-4.
392. Pearson, A.D., et al., *Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **285**(6334): p. 20-1.
393. Welcker, K., et al., *Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease*. Eur J Med Res, 2004. **9**(10): p. 456-60.
394. Jenkins, R.T., et al., *Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease*. Clin Invest Med, 1988. **11**(2): p. 151-5.
395. Soderholm, J.D., et al., *Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha*. Gut, 2004. **53**(12): p. 1817-24.
396. Fais, S., et al., *Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells*. J Interferon Res, 1994. **14**(5): p. 235-8.
397. Ryan, P., et al., *Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(8): p. 1539-43.
398. Martin, H.M., et al., *Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 80-93.
399. Adams, R.J., et al., *IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's disease than IgG against mannan or flagellin*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(2): p. 386-96.

400. Hanauer, S.B., et al., *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1541-9.
401. Sands, B.E., et al., *Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(9): p. 876-85.
402. Taupin, D. and D.K. Podolsky, *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 721-32.
403. Mammen, J.M. and J.B. Matthews, *Mucosal repair in the gastrointestinal tract*. Crit Care Med, 2003. **31**(8 Suppl): p. S532-7.
404. Dignass, A.U., J.L. Stow, and M.W. Babyatsky, *Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta*. Gut, 1996. **38**(5): p. 687-93.
405. Zbar, A.P., C. Simopoulos, and A.J. Karayiannakis, *Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution*. J Gastroenterol, 2004. **39**(5): p. 413-21.
406. Dignass, A.U. and D.K. Podolsky, *Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function in vitro*. Exp Cell Res, 1996. **225**(2): p. 422-9.
407. Hu, Y., et al., *The role of interleukin-1 in wound biology. Part I: Murine in silico and in vitro experimental analysis*. Anesth Analg. **111**(6): p. 1525-33.
408. Hu, Y., et al., *The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies*. Anesth Analg. **111**(6): p. 1534-42.
409. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Regional ileitis; a pathologic and clinical entity*. J Am Med Assoc, 1932. **99**(16): p. 1323-9.
410. Schaffler, A. and H. Herfarth, *Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research?* Gut, 2005. **54**(6): p. 742-4.
411. Olivier, I., et al., *Is Crohn's creeping fat an adipose tissue?* Inflamm Bowel Dis, 2010.
412. Olson, T.S., et al., *The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 541-52.
413. Ye, D., I. Ma, and T.Y. Ma, *Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(3): p. G496-504.
414. Fish, S.M., R. Proujansky, and W.W. Reenstra, *Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function*. Gut, 1999. **45**(2): p. 191-8.
415. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
416. Mankertz, J., et al., *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 11): p. 2085-90.
417. Dignass, A.U., *Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(1): p. 68-77.
418. Okamoto, R. and M. Watanabe, *Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD*. Dig Dis Sci, 2005. **50** Suppl 1: p. S34-8.
419. Ishimura, K., et al., *Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression*. World J Surg, 1998. **22**(10): p. 1069-75; discussion 1076.
420. Greca, F.H., et al., *Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats*. Acta Cir Bras, 2007. **22**(2): p. 110-4.
421. McFarland-Mancini, M.M., et al., *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7219-28.

422. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments* 10.1189/jlb.0504272. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-513.
423. Arnold, L., et al., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
424. Kucuk, C., et al., *Treatment with Met-RANTES decreases bacterial translocation in experimental colitis*. Am J Surg, 2006. **191**(1): p. 77-83.
425. Skugor, S., et al., *Exposure to lipopolysaccharide induces immune genes in cultured preadipocytes of Atlantic salmon*. Fish Shellfish Immunol, 2010. **29**(5): p. 817-24.
426. Davis, J.E., et al., *Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(6): p. 1248-55.
427. Sadler, D., C.A. Mattacks, and C.M. Pond, *Changes in adipocytes and dendritic cells in lymph node containing adipose depots during and after many weeks of mild inflammation*. J Anat, 2005. **207**(6): p. 769-81.
428. Patsouris, D., et al., *Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment*. J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 31223-35.
429. Bassaganya-Riera, J., et al., *F4/80hiCCR2hi macrophage infiltration into the intra-abdominal fat worsens the severity of experimental IBD in obese mice with DSS colitis*. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2009. **4**(2): p. e90-e97.
430. Hikawyj-Yevich, I. and J.A. Spitzer, *Endotoxin influence on lipolysis in isolated human and primate adipocytes*. J Surg Res, 1977. **23**(2): p. 106-13.
431. Yang, R., et al., *IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G621-9.
432. Fujimoto, M., et al., *The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 32-40.
433. Kurts, C., *Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 816-9.
434. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
435. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
436. Hovhannisyan, Z., et al., *Characterization of IL-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2010.
437. Sakuraba, A., et al., *Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1736-45.
438. Schaffler, A., et al., *Vascular endothelial growth factor secretion from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(9): p. 1419-23.
439. Schaffler, A., et al., *Secretion of RANTES (CCL5) and interleukin-10 from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease: regulation by steroid treatment*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(9): p. 1412-8.

440. Bose, T., et al., *Association of monocyte chemoattractant protein-1 with adipocyte number, insulin resistance and liver function markers*. J Med Primatol, 2009. **38**(6): p. 418-24.
441. Keophiphath, M., et al., *Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(1): p. 11-24.
442. Andarawewa, K.L., et al., *Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10862-71.
443. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
444. Kluwe, J., A. Mencin, and R.F. Schwabe, *Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis*. J Mol Med, 2009. **87**(2): p. 125-38.
445. Mirza, R., L.A. DiPietro, and T.J. Koh, *Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice*. Am J Pathol, 2009. **175**(6): p. 2454-62.
446. Brancato, S.K. and J.E. Albina, *Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function*. Am J Pathol. **178**(1): p. 19-25.
447. Leibovich, S.J. and R. Ross, *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol, 1975. **78**(1): p. 71-100.
448. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
449. Jiang, G.X., et al., *IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(8): p. 3813-8.
450. Walter, M.N., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*. Exp Cell Res, 2010. **316**(7): p. 1271-81.
451. Cressman, D.E., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1379-83.
452. Hurst, S.M., et al., *Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 705-14.
453. Mitsuyama, K., et al., *A form of circulating interleukin-6 receptor component soluble gp130 as a potential interleukin-6 inhibitor in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(1): p. 125-31.
454. Atreya, R., et al., *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 583-8.
455. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
456. Otte, J.M., et al., *Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro*. J Cell Biochem, 2008. **104**(6): p. 2286-97.
457. Vongsa, R.A., N.P. Zimmerman, and M.B. Dwinell, *CCR6 regulation of the actin cytoskeleton orchestrates human beta defensin-2- and CCL20-mediated restitution of colonic epithelial cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10034-45.

Mesenteric adipose tissue and creeping-fat in intestinal inflammation: pathophysiological description and involvement

Crohn's disease (CD) patients show an hypertrophy of mesenteric adipose tissue (MAT) and develop a creeping adipose tissue surrounding the inflammatory and ulcerated intestinal areas, referred to as creeping fat (CF). This CF was currently described as an extension of MAT. Although surgeons are familiar with CF and use it as an anatomical marker to delineate the extent of active disease, the pathophysiological relevance of this ectopic tissue remains unknown.

In the first time, we showed that MAT can loose the expression of adipose markers and more expresses inflammatory markers in two mice colitis model. In the second time, we set up an animal model experimental colitis allowing "CF-like" development. In this model we described the CF-like as a fibrous, inflammatory but not an adipose tissue. These results are in accordance with those observed in human CF samples collected from CD patients. In deed the leptin and adiponectin are less expressed, and IL-6 is highly expressed in CF tissue in comparaison with MAT collected from the same patients. In last, we evaluated the "CF-like" secretions in the intestinal epithelium. In non-inflamed conditions the "CF-like" secretions lead to an increase of colonic paracellular permeability (CPP) and a decrease of occluding expression. In contrast, in inflamed conditions the CF-like secretions not exacerbate the increase of CPP and the decrease of occludine expression initially observed in these inflammatory conditions. Moreover, CF-like secretions increase the proliferative, migratory and wound-healing capacity of colonic epithelial cells cultivated in-vitro.

For the first we established an experimental model of "CF-like" tissue development, offering the possibility to study and understand the nature, role and involvement of CF in Crohn's disease physiopathology. All these results suggest a dual role of CF secretions: "deleterious" effect in altering the epithelial barrier of non-inflamed tissues and "benefical" effect in healing intestinal tissue in inflamed conditions.

Les tissus adipeux mésentérique et rampant dans l'inflammation intestinale : description et implication physiopathologique.

Chez les patients souffrant de la maladie de Crohn, une hypertrophie du tissu adipeux mésentérique (TAM), ainsi que la présence d'un tissu ectopique d'aspect adipo-fibreux entourant les zones ulcérées de l'intestin sont décrites. Ce tissu ectopique appelé creeping-fat (CF) est couramment décrit comme une extension du TAM. Bien qu'utilisé comme marqueur de l'extension de la pathologie par les chirurgiens, la possible implication du CF dans la physiopathologie de la MC reste peu démontrée.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que le TAM montre une perte de son profil adipeux au profit d'un profil inflammatoire dans deux modèles de colite chimio-induite chez la souris. Dans un second temps, nous avons mis en place un modèle murin de colite sévère entraînant le développement de « CF-like ». Ce modèle nous a permis de décrire le « CF-like » comme un tissu fibreux, inflammatoire, mais non adipeux. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des échantillons de CF humains provenant de pièces opératoires de patients souffrants d'une MC. Ces résultats montrent également une diminution de l'expression de leptine et d'adiponectine ainsi qu'une augmentation de l'expression d'IL-6 dans le CF en comparaison au TAM de ces mêmes patients. Enfin, nous avons étudié l'implication du « CF-like », via ses sécrétions, sur l'épithélium intestinal. En condition non-inflammatoire, les sécrétions de CF-like entraînent une augmentation de la perméabilité paracellulaire colique et une diminution de l'expression de l'occludine. Au contraire, en conditions micro-inflammatoires, les sécrétions de CF-like n'exacerbent pas l'augmentation de la perméabilité paracellulaire colique ainsi que la diminution de l'expression de l'occludine initialement observées dans ces conditions inflammatoires. D'autre part, les sécrétions du « CF-like » augmentent la capacité proliférative, migratoire et de réparation d'un tapis de cellules épithéliales coliques en culture.

Nous avons donc pu pour la première fois mettre en place un modèle expérimental de CF-like, permettant de mieux appréhender la nature et l'implication de ce tissu dans la maladie de Crohn. L'ensemble de ces résultats nous permet de suggérer que le CF via ses sécrétions serait un tissu à double facette : « délétère » en altérant la barrière digestive des tissus non inflammatoires et « bénéfique » dans la réparation tissulaire intestinale des tissus inflammatoires.